Untersuchungen über die Beziehungen zwischen Glukose-Stoffwechsel und Wassereinlagerung in Kaninchen-Hirnschnitten unter der Einwirkung von Hemmstoffen und Entkopplern

INAUGURALDISSERTATION

zur Erlangung der Doktorwürde der

HOHEN MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
DER UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

vorgelegt von

Hans-Jürgen Seifert

Saarbrücken

1973

1974

Aus dem Fachbereich 4 Fachrichtung Neurochirurgie der
Universität des Saarlandes

Untersuchungen über die Beziehungen zwischen Glukose-Stoffwechsel und Wassereinlagerung in Kaninchen-Hirnschnitten unter der Einwirkung von Hemmstoffen und Entkopplern

I N A U G U R A L D I S S E R T A T I O N

zur Erlangung der Doktorwürde
der
HOHEN MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
DER UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

1973

vorgelegt von
Hans-Jürgen Seifert
geb. am 21.9.1943 in Würzburg

Dekan: Prof. Dr. med. G. A. Jutzler

Referenten: Prof. Dr. med. F. Loew
Prof. Dr. rer. nat. V. Ullrich

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Tag der mündlichen Prüfung: 5. April 1974

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
I.	EINLEITUNG	1
	1. Eigene Versuchsanordnung	1
	2. Literaturübersicht	2
	3. Fragestellung	7
II.	METHODIK	8
	1. Präparation des Materials	8
	2. Warburg-Versuche	10
	3. Trockensubstanz-Bestimmungen	13
	4. Substrat-Bestimmungen	14
	a. Glukose	14
	b. Laktat	15
	c. Pyruvat	16
III.	ERGEBNISSE	18
	1. Aerobe Glykolyse	18
	2. Atmung	23
	3. Glukose-Verbrauch	48
	4. Laktat-Bildung	48
	5. Pyruvat-Bildung	48
	6. Schwellung	60
IV.	DISKUSSION	66
V.	ZUSAMMENFASSUNG	75
VI.	LITERATURVERZEICHNIS	77

ABKÜRZUNGEN

zykl. AMP	=	zyklisches Adenosin-3',5'-monophosphat
ADP	=	Adenosin-5'-diphosphat
ATP	=	Adenosin-5'-triphosphat
ATPase	=	Adenosin-5'-triphosphatase
CSF	=	Cerebrospinalflüssigkeit
GAPDH	=	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GlDH	=	Glutamat-Dehydrogenase
GOT	=	Glutamat-Oxalat-Transaminase
G-6-PDH	=	Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase
HK	=	Hexokinase
LDH	=	Lactat-Dehydrogenase
NAD^+	=	Nicotinamid-adenin-dinucleotid
NADH	=	Nicotinamid-adenin-dinucleotid, reduziert
$NADP^+$	=	Nicotinamid-adenin-dinucleotidphosphat
NADPH	=	Nicotinamid-adenin-dinucleotidphosphat, reduziert
PGK	=	3-Phosphoglycerat-Kinase
Trs.	=	Trockensubstanz

I. EINLEITUNG

1. Eigene Versuchsanordnung

Im Rahmen eines größeren Untersuchungsprogrammes über Hirnödeme (24, 25, 40) werden im Labor der Neurochirurgischen Universitäts-Klinik in Homburg folgende Messungen an Schnitten von Kaninchenhirn durchgeführt: O_2-Verbrauch und CO_2-Bildung in bikarbonathaltiger Lösung, Glukose-Verbrauch, Laktat- und Pyruvat-Bildung und die Wasseraufnahme der Schnitte während der Inkubation. Alle Messungen haben das Ziel folgender drei vergleichender Gegenüberstellungen:
Stoffwechsel des gesunden Gehirns - Stoffwechsel des kältegeschädigten Gehirns.
Stoffwechsel des gesunden und kältegeschädigten Gehirns bei Konzentrationsveränderung von Glukose, O_2, Bikarbonat und CO_2.
Stoffwechsel des gesunden und kältegeschädigten Gehirns ohne Zusatz von Substanzen - bei Zusatz von Substanzen.

Die vorliegende Arbeit soll über Versuche berichten, bei denen der Stoffwechsel in Gegenwart von Hemmstoffen und Entkopplern untersucht wird. Es werden einige Experimente mit Substanzen beschrieben, deren Wirkung aus der Literatur bekannt ist: 2,4-Dinitrophenol, Etacrynsäure = [2,3-Dichlor-4-(2-methylenbutyryl)-phenoxy] essigsäure, Glycerinaldehyd, Jodessigsäure und Ouabain = g-Strophanthin. Diese Versuche sollen lediglich sicherstellen, daß die Versuchsanordnung funktioniert und in reproduzierbarem Umfang die zu erwartenden Ergebnisse bringt.
In anderen Untersuchungen wurden Substanzen zugesetzt, die entweder bereits zur Therapie von Hirnödemen empfohlen worden sind oder möglicherweise den Glukose-Stoffwechsel von

Hirngewebe beeinflussen. Hier wurden einige unerwartete und nach dem allgemeinen Schrifttum auch neue Beobachtungen gemacht.

2. Literaturübersicht

Aus Untersuchungen von ISHII (47) und ISHII, EVANS et al. (48) ist bekannt, daß der Wasser-Gehalt in vitro inkubierter Hirnschnitte durch Einwirkung von Natriumazid und Dinitrophenol beträchtlich gesteigert wird. Der Effekt beruht auf Hemmung bzw. Entkopplung des energieliefernden Stoffwechsels. Eine Übersicht über die Schwellung von Hirngewebe in vitro, beruhend auf einer Zusammenfassung eigener Untersuchungen (80, 81, 83, 84, 85, 86, 87, 88) und einer Übersicht über die Literatur, hat H.M. PAPPIUS (82) geschrieben.
Einige bekannte Eigenschaften der in dieser Arbeit verwendeten Hemmstoffe und Entkoppler sollen zunächst besprochen werden:

2,4-Dinitrophenol = DNP

Die Erniedrigung der Konzentration energiereicher Phosphate durch DNP wurde in verschiedenen Zellen seit langem beobachtet: KVAMME (58); DALLNER und ERNSTER (21) und andere Autoren machten dazu Messungen an Aszites-Tumorzellen. SCHULZ und HOFMANN (101) wiesen an Aszites-Tumorzellen nach, daß 0,5 - 1 mM DNP die Glykolyse-Geschwindigkeit maximal steigert und dennoch die ATP-Synthese vollständig hemmt. Außerdem ist bekannt, daß DNP die durch Röntgenstrahlen gesteigerte Atmung von Nierenschnitten beeinflußt (11) und den Pyruvat-, Glukose- und Acetat-Einbau in verschiedene isolierte Rattengewebe hemmt (45, 108). An Mitochondrien, die ein Hauptgegenstand der Erforschung biochemischer Grundreaktionen sind,

wurde die Steigerung bzw. Induktion von ATPase-Aktivität bei Einwirkung von DNP durch etliche Autoren nachgewiesen (22, 27, 29, 89, 94, 121). LEHNINGER et al. (61) wiesen darüberhinaus auch auf den durch DNP stimulierten ATP-PO_4-Austausch hin. Die Verringerung der Energieausbeute bei der oxydativen Phosphorylierung wiesen DIANZANI et al. (23) auch an Mitochondrien von Ratten nach, denen zuvor DNP in vivo appliziert worden war (Konzentration etwa 0,16 mM entsprechend). Die in Gegenwart von DNP zwar stimulierte, aber von der Energiebildung entkoppelte Atmung hemmt die Anhäufung reduzierter Pyridinnucleotide in Gegenwart von überschüssigem Substrat (8), sie hemmt auch die Reduktion von Acetoacetat durch Rattenleber-Mitochondrien in Gegenwart von Succinat (28). Bei sehr kleinen Substrat-Konzentrationen kann allerdings die Atmungsstimulierung durch DNP aufgehoben werden (15). Auch die Freisetzung von Mitochondrien-Enzymen wie GIDH und GOT durch DNP wurde nachgewiesen (30). Infolge seiner Wirkung auf die Konzentration energiereicher Phosphate verursacht DNP eine Schrumpfung von Mitochondrien, verbunden mit einem Ausstrom von Ionen (50, 61, 112). Die Verringerung des K^+-Gehaltes infolge Absinkens der Konzentration energiereicher Phosphate wurde von SCHOTT et al. (100) auch an Vorhöfen von Froschherzen nachgewiesen.
An Hirnschnitten in vitro hat SKLENOVSKÝ (107) eine starke Freisetzung von Glutaminsäure in das Medium unter dem Einfluß von 0,1 mM DNP nachgewiesen.

Etacrynsäure = EA

Etacrynsäure ist ein klinisch verwendbares Diuretikum (31, 33, 46, 57, 76, 95, 102). 0,01 - 1 mM EA hemmt die Glykolyse von Ehrlich-Aszites-Tumorzellen und von Erythrocyten (37). Die Hemmung beruht vermutlich auf einer Einwirkung auf die

GAPDH (38). Auch andere SH-haltige Enzyme wie Succinat-Dehydrogenase, Prolin-Oxidase und Lipoamid-Dehydrogenase werden durch etwa 1 mM EA stark gehemmt (56). 0,01 - 1 mM EA hemmt die Atmung von Nierenschnitten, 0,1 - 1 mM EA hemmt deren Glykolyse. 1 mM EA hemmt die Glykolyse von Nierenmark und -rinde von Ratte, Kaninchen und Mensch, von Wasserschildkröten-Blasen-Epithelien und von Hämolysaten des Menschen (54). MACKNIGHT (67) wies an Nierenschnitten in Gegenwart von 1 mM EA eine Hemmung der Atmung und auch eine Verstärkung der Schwellung mit Anstieg des Na^+-Gehaltes und Abfall des K^+-Gehaltes nach. Im Gegensatz dazu wiesen zwar LANDON et al. (60) eine Abnahme des intrazellulären K^+ unter 0,1 mM EA nach, sie fanden aber keine Beeinflussung der Zellatmung oder des Zellvolumens. Mitochondriale Atmung und mitochondriale ATPase-Aktivität wurden dagegen gehemmt. Eine Änderung der Permeabilität von Mitochondrien gegenüber Mg^{2+} und K^+ beobachtete auch GOLDSCHMIDT et al. (35). EA ist heute mit Sicherheit als ein Hemmstoff der ATPase zu betrachten (3). In der Neurochirurgie wurde mit EA eine Abnahme des CSF-Flusses festgestellt (72), und die Substanz wurde auch schon mehrfach zur Senkung des intrakraniellen Drucks empfohlen (73, 122).

Glycerinaldehyd = GA

GA, welcher ein physiologisches Zwischenprodukt des Abbaues von Fruktose in der Leber ist (53), gewann durch eine Arbeit von WARBURG et al. (120), die an ältere Arbeiten von MENDEL (70) anknüpft, Interesse als Hemmstoff der Glykolyse, an das sich sogar vorübergehend klinische Hoffnungen in der Chemotherapie von Geschwulstkrankheiten knüpften. Die Glykolyse-Hemmung durch 2 mM GA wurde von BICKIS und QUASTEL (6) an Tumorzellen bestätigt. DREWS et al. (26) wiesen neben

der Glykolyse-Hemmung auch eine Hemmung des Glycin-Einbaus und der Atmung nach. SCHARFF et al. (98) fanden Hemmwirkungen des GA auf den anaeroben Glukose-Stoffwechsel in der Augenlinse. Andererseits beobachtete PERIN (90), daß die oxydative Phosphorylierung von Lebermitochondrien in Gegenwart von Succinat durch GA verstärkt wird.

Jodessigsäure = IAA

Die Hemmung der Glykolyse durch 0,1 mM IAA wurde an Aszites-Tumorzellen nachgewiesen (6). Nach COE (17) ist über die Glykolyse-Hemmung durch 0,1 mM IAA auch eine Beeinflussung des Crabtree-Effektes zu erwarten. KVAMME (58) findet allerdings in seinen Versuchen diese Beziehung nicht. 2,5 - 10 mM IAA hemmt auch die Glykolyse in peripheren Nerven (75). Eine der Wirkungen der IAA beruht mit Sicherheit auf einer Reaktion mit SH-Gruppen von Enzymen wie z.B. der GAPDH (116).

Ouabain

Die Hemmwirkung von 0,01 - 0,1 mM Ouabain auf die ATPase-Aktivität ist seit längerer Zeit bekannt und wurde an verschiedenen Geweben bzw. Zellarten nachgewiesen. Mit Hirngewebe untersuchten HESS (42), CREMER (20), CHAN und QUASTEL (16), OKAMOTO und QUASTEL (77) und PITTS et al. (92) die Beeinflussung der ATPase-Aktivität durch Ouabain. Auch an Muskelpräparaten wurde durch die ATPase-Hemmung durch Ouabain eine Verschiebung der Elektrolyte gemessen (2, 10, 55). Während beim Muskel unter Ouabain-Einwirkung das intrazelluläre K^+ abnimmt, und das intrazelluläre Na^+ zunimmt, sind die Verhältnisse an Leberzellen bei in vivo-Anwendung von Ouabain umgekehrt (123, 125). Auch an in vitro gezüchteten L-Zellen nimmt unter 0,1 mM Ouabain das intrazelluläre K^+ ab und Na^+ zu; 1 mM DNP und

0,1 mM IAA müssen gemeinsam angewandt werden, um hier maximale Hemmung der K^+-Aufnahme zu verursachen (59). Auch an Erythrocyten wurde der Ouabain-Effekt auf den Na^+-Transport untersucht (118). OPIT et al. (78) haben ein Modell für die Hemmung der ATPase durch Ouabain entwickelt, das darauf beruht, daß aus dem energiereichen Enzymprotein-Phosphat-Zwischenprodukt die Phosphat-Abspaltung und Rückgewinnung des Enzyms gehemmt wird. An Hirnschnitten wurde unter dem Einfluß von Ouabain auch eine Anreicherung von Ca^{2+} nachgewiesen (110, 115); STAHL und SWANSON (111) und COOKE et al. (19) wiesen nach, daß 0,1 mM Ouabain etwa die gleiche Wirkung auf die Ca^{2+}-Anreicherung in Hirnschnitten hat wie 0,1 mM DNP, 1 mM Jodacetat oder 5 mM Glutamat. Die Freisetzung von Aminosäuren aus Hirnschnitten bzw. ihr Austausch gegen das Medium werden durch 0,01 - 0,02 mM Ouabain verstärkt (9, 20, 52, 106). CREMER (20) wies bei Versuchen mit 0,2 mM Ouabain auch nach, daß, gemessen an der Abnahme der Konzentration einiger Aminosäuren in den Schnitten, 11 mM Glukose ein besser geeignetes Substrat für Hirnschnitte ist als 11 mM Pyruvat. Infolge der K^+-Verarmung der Zellen nehmen unter Ouabain-Einwirkung auch die Oxydation von Glukose durch Hirngewebe (91, 113) und der glykolytische Abbau von Glukose durch Ehrlich-Aszites-Tumorzellen ab (93). Ouabain hat aber auch eine Reihe von Wirkungen, die entweder nicht mit der Wirkung auf die Na^+-K^+-abhängige ATPase zusammenhängen oder deren Zusammenhang lediglich noch unbekannt ist: Es hemmt GAPDH oder PGK (96); es hemmt auch die Bildung von CSF und den Transport von Glukose aus den Ventrikeln in Hirngewebe (12, 13); sehr geringe Ouabain-Konzentrationen (10^{-9} - 10^{-7} mM) stimulieren andererseits CSF-Bildung und auch Na^+-K^+-ATPase-Aktivität (79);

es beeinflußt auch den Einbau von Phosphat in Phospholipoide (1), fördert die Herauslösung von Thiamin aus Ischiasnerv und Spinalmark (49), verringert die posttetanische Hyperpolarisation nicht-myelinhaltiger Nervenfasern (41) und stimuliert die Bildung von cycl. AMP aus endogenem ATP (105). Schließlich hat Ouabain auch insulin-ähnliche Wirkungen, indem es bei isolierten Fettzellen den Einbau von Glukose in Lipide stimuliert und die Lipolyse hemmt (43, 44). Die Insulin-Sekretion selbst kann vermutlich durch Ouabain ebenfalls gesteigert werden (117).

Die in der Einleitung bisher erwähnten und in ihrer Wirkung beschriebenen Substanzen haben eine gemeinsame Eigenschaft: Sie verstärken die Schwellung von Hirnschnitten in Salzlösung. Sie sind in meiner Arbeit verwendet worden, um zu prüfen, ob das Testsystem die aus der Literatur zu erwartenden Effekte zeigt: Hemmung oder Entkopplung des Glukose-Stoffwechsels und Verstärkung der Schwellung der Schnitte.

3. Fragestellung

Für die vorliegende Arbeit ergeben sich folgende zwei Fragestellungen:

1.) Sind die aus der Literatur bekannten Effekte von 2,4-Dinitrophenol, Etacrynsäure, Glycerinaldehyd, Jodessigsäure und Ouabain an kleinen Schnitten aus normalem und ödematösem Kaninchenhirn reproduzierbar?

2.) Lassen sich andere Substanzen finden, die die Schwellung der Hirnschnitte in vitro verstärken, entweder in Verbindung mit Hemmung oder mit Entkopplung des energieliefernden Glukose-Stoffwechsels?

II. METHODIK

Es wurden Kaninchen beiderlei Geschlechts von durchschnittlich 2 - 3 kg Körpergewicht ohne Berücksichtigung der Rasse verwendet.

1. Präparation des Materials

Unter Lokalanästhesie mit Scandicain^{R} wurde auf der rechten Schädelhälfte eine quadratische Trepanation von etwa 11 mm Kantenlänge gesetzt. Die Öffnung reichte maximal 2 mm an die Mittellinie heran und bis zum oberen Orbitarand. Die Kranznaht lag im vorderen Drittel der Trepanation. Die Dura mater blieb unbeschädigt. Ein Kupferwürfel von 8 mm Kantenlänge wurde in Azeton-Kohlensäure-Schnee auf ca. -70° C gekühlt und 30 Sekunden lang auf die intakte Dura mater unter der Trepanation ohne zusätzlichen Druck gehalten. Nach Abspülen äußerlich anhaftenden Eises mit destilliertem Wasser wurde Nebacetin^{R}-Puder auf die Dura mater gestreut und anschließend die Wunde vernäht. 24 Stunden nach Setzen des Kälteödems wurden die Tiere durch Luftembolie getötet und der Schädel geöffnet. Nach Aufschneiden der Dura mater längs der Mittellinie wurde das Gehirn mit einem Löffel herausgenommen und sofort in eisgekühlte Salzlösung gegeben. Die Zeit zwischen Tod der Tiere und Herausnahme des Gehirns betrug im Durchschnitt 3 - 5 Minuten.
Die Salzlösung wird abgekürzt „K-Lösung" genannt und hat folgende Zusammensetzung:

NaCl	106	mM
KCl	4,7	mM
$CaCl_2$	2,5	mM
$MgSO_4$	0,8	mM

KH_2PO_4	0,3	mM	
Na_2HPO_4	1,2	mM	
$NaHCO_3$	25	mM	(bzw. 8 oder 20 mM)
Glukose	5	mM	

Anschließend wurde in einer von außen durch Eisstückchen gekühlten Petrischale von beiden Hirnhemisphären (ungeschädigte und kältegeschädigte) aus einander möglichst genau entsprechenden Hirnregionen zwei Streifen von etwa 5 mm Breite, von der Mittellinie nach temporal verlaufend, entnommen. Die Streifen grenzten bis an die Ventrikel und lagen so, daß sie auf der kältegeschädigten Seite unmittelbar occipital an die nekrotisch gewordene Stelle der Kälteeinwirkung angrenzten. Nach Abpräparieren von kortikalen Gefäßen, Arachnoidea und weißer Substanz wurde die graue Substanz mit Skalpell und Pinzette in Scheiben von maximal 0,3 mm Dicke und 0,5 - 1 mm Kantenlänge geschnitten, die möglichst schnell in kalte „K-Lösung" gegeben wurden.

Ein Stück von 50 - 80 mg Frischgewicht wurde direkt nach Abtupfen anhaftender Flüssigkeit gewägt und zur Trockensubstanz-Bestimmung verwendet.

Nach mehrmaligem Waschen (Aufwirbeln mit frischer „K-Lösung", Absetzenlassen und Abgießen der Lösung) wurden die Schnitte in Faltenfiltern von der „K-Lösung" abgetrennt und mit einer Pinzette möglichst gleichmäßig in vorbereitete Reaktionsgefäße nach WARBURG verteilt. Es wurden Kegelgefäße mit grossem Anhänger und Birne (B. BRAUN Apparatebau, Melsungen, Best.-Nr. A 06-65) verwendet.

2. Warburg-Versuche

Bei aerober Inkubation tierischer Schnitte in Salzlösungen mit Bikarbonat und Substrat wird O_2 verbraucht (Atmung) und CO_2 gebildet (Atmung und aerobe Glykolyse). Das Problem ist also, gleichzeitig den O_2-Verbrauch, der eine Druckabnahme im manometrischen System verursacht, und die CO_2-Bildung, die zu einer Druckzunahme führt, zu messen.
Bei der Zwei-Gefäß-Methode nach WARBURG wird dieses Problem folgendermaßen gelöst: In das Gefäß I wird „K-Lösung" mit Schnitten gegeben, in das Gefäß II wird die gleiche Menge „K-Lösung" mit ungefähr der gleichen Schnittmenge gegeben, außerdem füllt man in den großen Anhänger dieses Gefäßes einen 3molaren $KHCO_3$ - K_2CO_3 - Puffer solcher Zusammensetzung, daß er mit einem bestimmten CO_2-Partialdruck im Gleichgewicht steht (für 5% CO_2 ist das Mischungsverhältnis bei 38° C 79 : 21). Zu 2,9 ml Puffer gibt man noch 2 mg Karboanhydrase, gelöst in 0,1 ml Wasser, zu. Dieser Puffer bindet bis auf einen kleinen, in methodischen Vorversuchen bestimmbaren, Rest das beim Stoffwechsel gebildete CO_2.
In Gefäß I mißt man also die Differenz aus Druckzunahme (CO_2-Bildung) und Druckabnahme (O_2-Verbrauch). In Gefäß II mißt man dagegen die durch den O_2-Verbrauch verursachte Druckabnahme. Unter der Annahme eines annähernd homogenen Materials und damit gleichen Stoffwechsels in beiden Gefäßen kann man aus den Druckänderungen in den Systemen I und II mit zwei Gleichungen die beiden Unbekannten X_{O_2} und X_{CO_2} berechnen. Voraussetzung ist jedoch, daß vor der rechnerischen Auswertung die Druckänderungen aller Systeme auf 1 mg Trockensubstanz umgerechnet werden.

Die Auswertung geschieht nach folgenden Formeln:

$$X_{O_2} = \Delta H \cdot \frac{K^R_{CO_2}}{\frac{K^R_{CO_2}}{K_{O_2}} - \frac{K'^R_{CO_2}}{K'_{O_2}}} - \Delta H' \cdot \frac{K'^R_{CO_2}}{\frac{K^R_{CO_2}}{K_{O_2}} - \frac{K'^R_{CO_2}}{K'_{O_2}}}$$

$$X_{CO_2} = \Delta H \cdot \frac{K_{O_2}}{\frac{K_{O_2}}{K^R_{CO_2}} - \frac{K'_{O_2}}{K'^R_{CO_2}}} - \Delta H' \cdot \frac{K'_{O_2}}{\frac{K_{O_2}}{K^R_{CO_2}} - \frac{K'_{O_2}}{K'^R_{CO_2}}}$$

Hierbei sind K_{O_2} und $K^R_{CO_2}$ die Gefäßkonstanten, die nach folgender Formel berechnet werden:

$$K = \frac{V_G \cdot \frac{273}{311} + V_F \cdot \alpha}{10}$$

ΔH und $\Delta H'$ sind die Druckänderungen in System I und II (der Zusatz „ ' " bedeutet: System II), V_G = Volumen des Gasraumes, V_F = Volumen der Flüssigkeit, α = Bunsenscher Absorptionskoeffizient. Der Zusatz „ R " bedeutet, daß die Konstanten beider Gefäße mit der Retention der „K-Lösung" (0,03 mm^3/ml Lösung und mm Brodie) und die der Gefäße II mit der Retention des $KHCO_3$ - K_2CO_3 - Puffers (bei der Begasung mit 4% CO_2: 12,82 mm^3 CO_2/ml Puffer und mm Brodie, bei der Begasung mit 5% CO_2: 9,16 mm^3 CO_2/ml Puffer und mm

Brodie, bei der Begasung mit 6,3% CO_2: 6,66 mm^3 CO_2/ml Puffer und mm Brodie) berücksichtigt: $K^R_{CO_2} = K_{CO_2} + V_P \cdot R$ (V_P = Volumen des Puffers).

Wenn man immer die gleichen Gefäße mit den gleichen Manometern kombiniert und gleiche Flüssigkeitsmengen einfüllt, kann man die Gefäßkonstanten und die Brüche obiger Gleichungen tabellieren und kommt so zu folgenden einfacheren Formeln:

$$X_{O_2} = \Delta H \cdot A - \Delta H' \cdot B$$

$$X_{CO_2} = \Delta H \cdot C - \Delta H' \cdot D$$

Zur weiteren Vereinfachung wurde ein Computer-Programm entwickelt (64), das die gesamte Rechnung durchführt und folgende Zahlenwerte ausdruckt: X_{O_2}, X_{CO_2}, X_M, Q_{O_2}, Q_{CO_2} und Q_M. Hierbei bedeuten die X-Werte die Gasumsätze, ausgedrückt in mm^3 pro mg Trockensubstanz, und die Q-Werte entstehen bei der Umrechnung der X-Werte auf 60 Minuten Versuchsdauer.

Die X_M-Werte geben die aerobe Milchsäurebildung an und lassen sich aus den X_{O_2}- und X_{CO_2}-Werten unter der Annahme eines respiratorischen Quotienten von 1 nach folgender Formel berechnen:

$$X_M = X_{CO_2} + X_{O_2}$$ (X_{O_2} mit negativem Vorzeichen).

Praktisch geht man folgendermaßen vor: Der Hauptraum aller Gefäße enthält 3 ml „K-Lösung", wenn während des Versuches keine Substanz zugesetzt werden soll. Bei beabsichtigter Zugabe von Substanzen enthält der Hauptraum 2,7 ml „K-Lösung", während 0,3 ml „K-Lösung" mit den darin gelösten Wirkstoffen in die Birne eingefüllt werden. Der große Anhänger der Ge-

fäße enthält Wasser (Gefäß I) bzw. Karbonat - Bikarbonat - Puffer mit Karboanhydrase (Gefäß II).

Nach Einfüllen der Hirnschnitte werden die Gefäße an den Manometern befestigt, wobei die Schliffe mit einem Gemisch aus Kolophonium und Adeps Lanae abgedichtet werden. Mit geöffneten Hähnen und Kapillarstopfen werden die Gefäße im Thermostaten von 38° C hängend 10 Minuten lang mit dem Gasgemisch durchströmt, unter dem später gemessen werden soll. Dabei wird mit einer Frequenz von ca. 30 pro Minute geschüttelt; nach Schließen der Hähne wird die Schüttelfrequenz während der Messung auf 80 pro Minute gehalten. Nach Beendigung der Inkubation werden die Suspensionen der Schnitte mit leicht gekrümmten Glasröhrchen und Gummisaugern vollständig aus den Gefäßen in Zentrifugengläser überführt und 10 Minuten lang bei ca. 3000·g zentrifugiert. Die Überstände werden in andere Gefäße abgegossen und zur späteren chemischen Untersuchung bei -40° C eingefroren und gelagert.

3. Trockensubstanz-Bestimmungen

Der Wassergehalt des Hirngewebes vor dem Warburg-Versuch wurde, wie schon auf Seite 9 angegeben, an einem Stück Hirngewebe ermittelt, das weder geschnitten noch inkubiert wurde. Die nach Abzentrifugieren der Schnitte überstehende „K-Lösung" wurde in andere Gefäße abgegossen und zur späteren chemischen Untersuchung bei -40° C aufbewahrt. Die Gläser mit den Schnitten wurden weiterhin mit der Öffnung schräg nach unten gehalten und ihre Wandungen mit einem Zellstofftupfer bis dicht an die Schnitte abgetrocknet.

Die inkubierten und nicht-inkubierten Hirnproben wurden ca.

24 Stunden bei 105° C getrocknet und nach Abkühlen im Exsikkator über Blaugel gewägt. Aus Frisch- und Trockengewicht wurde der Wassergehalt des Hirngewebes berechnet, ausgedrückt in % des Gesamtgewichtes.

4. Substrat-Bestimmungen (5, 119)

a.) Glukose

Glukose wurde mit der enzymatischen Methode bestimmt, die von BOEHRINGER Mannheim für die Testpackungen zur Bestimmung der Glukose im Blut angegeben wird. Dabei wird Glukose zunächst mit ATP und Hexokinase phosphoryliert, das gebildete Glukose-6-phosphat wird mit NADP und Glukose-6-phosphat-Dehydrogenase zu 6-Phosphoglukonat oxydiert; die Bildung von NADPH wird optisch durch Verfolgung des Extinktionsanstiegs bei 334 nm gemessen.

$$\text{Glukose} + \text{ATP} \xrightarrow{\text{HK}} \text{Glukose-6-phosphat} + \text{ADP}$$

$$\text{Glukose-6-phosphat} + \text{NADP} \xrightarrow{\text{G-6-PDH}} \text{6-Phosphoglukonat} + \text{NADPH} + \text{H}^+$$

Um Zeit und Material zu sparen, wird für alle durchzuführenden Bestimmungen (Glukose, Laktat, Pyruvat) nur eine Enteiweißung jeder Probe gemacht. Dabei werden zu:

1,0 ml Probe

\+ 4,0 ml 0,165 M kalte $HClO_4$ gegeben.

Nach mehrstündigem Stehenlassen im Kühlschrank wird eine gekühlte Lösung von 3,0 ml 1,1 M K_2HPO_4 zugegeben. Nach Aufbewahrung im Kühlschrank über Nacht werden die Niederschläge von denaturiertem Eiweiß und Kaliumperchlorat 10 Minuten lang bei 3000·g abzentrifugiert und der Überstand zur Glukose-(bzw.

Laktat- und Pyruvat-)Bestimmung eingesetzt.

Zur Messung von Glukose werden in eine Küvette von 1 cm Schichtdicke gegeben:

2,60 ml Triäthanolaminpuffer, 0,3 M, pH 7,5 mit 4 mM $MgSO_4$
+ 0,20 ml enteiweißte Probe
+ 0,10 ml 12 mM NADP
+ 0,10 ml 16 mM ATP.

Nach sorgfältigem Durchmischen mit einem Plastikspatel wird die Extinktion bei 334 nm abgelesen. Die Reaktion wird durch Zufügen von
+ 0,02 ml eines Enzymgemisches mit 1 mg Hexokinase und 2 mg Glukose-6-phosphat-Dehydrogenase pro ml gestartet. Nach 30 Minuten wird die Extinktion bei 334 nm wiederum abgelesen.

b.) Laktat

Laktat wird ebenfalls nach einer Vorschrift von BOEHRINGER Mannheim enzymatisch bestimmt. Hierbei wird Laktat mit NAD und LDH zu Pyruvat und NADH umgesetzt. Aus der Extinktionszunahme bei 334 nm wird die Laktatkonzentration der Proben berechnet.

$$\text{Laktat} + \text{NAD} \xrightarrow{\text{LDH}} \text{Pyruvat} + \text{NADH} + H^+$$

In eine Küvette von 1 cm Schichtdicke werden gegeben:

2,00 ml Glyzinpuffer, 0,5 M, pH 9,0 mit 0,4 M Hydrazin,
+ 0,20 ml enteiweißte Probe
+ 0,03 ml Schweinemuskel-LDH mit 2 mg pro ml
+ 0,20 ml 27 mM NAD.

Der Zusatz von Hydrazin zum Reaktionsgemisch hat den Zweck, das gebildete Pyruvat als Hydrazon abzufangen und so aus dem

Reaktionsgemisch zu entfernen.
Bei den Leerwerten wird anstelle von Probe die gleiche Menge reiner „K-Lösung" bzw. „K-Lösung" + Substanzzusatz eingesetzt. Nach sorgfältigem Mischen der Lösungen in den Küvetten werden die Ansätze bei Raumtemperatur stehengelassen. Genau 1 Stunde nach Zugabe der NAD-Lösung wird in allen Ansätzen die Extinktion bei 334 nm gemessen.

c.) Pyruvat

Pyruvat wird ebenfalls nach einer Vorschrift, die den Testpackungen von BOEHRINGER Mannheim beiliegt, enzymatisch bestimmt. Der Verbrauch von NADH bei der Inkubation der Proben in gepufferter Lösung mit LDH wird bei 334 nm optisch gemessen.

$$\text{Pyruvat} + \text{NADH} + \text{H}^+ \xrightarrow{\text{LDH}} \text{Lactat} + \text{NAD}$$

Wegen der geringen Pyruvatkonzentration werden die Proben nicht mit Puffer verdünnt, sondern direkt zur Bestimmung eingesetzt. Die auf Seite 14 beschriebene Enteiweißung ist so eingerichtet, daß am Ende eine Lösung mit einem pH von ca. 7,6 vorliegt. Da die Extinktion auch nach Ablauf der LDH-Reaktion ständig sehr langsam weiter abnimmt, werden bei jeder Probe mehrere Ablesungen nach einem genauen Minutenplan durchgeführt, um später von der insgesamt gemessenen Extinktionsänderung den „Schleich" abziehen zu können.
In eine Küvette von 1 cm Schichtdicke werden gegeben:
2,00 ml enteiweißte und zentrifugierte Probe
+ 0,05 ml 12 mM NADH.
Nach sorgfältigem Mischen wird die Extinktion bei 334 nm abge-

lesen, und die Reaktion wird durch Zugabe von + 0,05 ml Schweinemuskel-LDH mit 0,75 mg pro ml gestartet. Nach genau 5 und 10 Minuten werden erneut die Extinktionen bei 334 nm abgelesen.
Als Leerwerte dienen die reine „K-Lösung" bzw. „K-Lösung" + Substanzzusatz. Die Substanzen werden der „K-Lösung" jeweils in den gleichen Konzentrationen zugegeben wie den Warburg-Gefäßen des gleichen Versuches.

Bei den letzten Versuchen der Serien wurden die Extinktionen nicht mehr einzeln abgelesen, sondern auf einem Schreiber laufend registriert, der an das Photometer EPPENDORF angeschlossen ist.

Außerdem wurde die rechnerische Auswertung für Glukose, Laktat und Pyruvat bei den letzten Versuchen der Serien nicht mehr handschriftlich, sondern auf einem CDC-Computer im Rechenzentrum Homburg der Universität Saarbrücken nach einem eigenen Programm (64) durchgeführt.

III. ERGEBNISSE

In den folgenden Tabellen und Abbildungen werden die Ergebnisse sämtlicher Versuche gebracht, die mit den in meiner Arbeit erwähnten Substanzen durchgeführt worden sind.

1. Aerobe Glykolyse

Die Tabellen 1a. und 1b. enthalten die Stoffwechselquotienten der aeroben Glykolyse, getrennt nach glykolyse-hemmenden und glykolyse-steigernden Substanzen. Die Stoffwechselquotienten Q_M wurden nach dem auf Seiten 10-12 angegebenen Verfahren berechnet. Die prozentuale Veränderung der Q_M-Werte unter dem Einfluß der erwähnten Substanzen ist aus den Tabellen ohne weiteres verständlich. Drei Erläuterungen müssen lediglich zum Verständnis der Höhe der Q_M-Werte bei den Kontroll-Versuchen gemacht werden:

a) Die einzelnen Versuche gehören zu Serien, in denen systematisch O_2- und CO_2-Partialdrucke sowie Bikarbonat-Konzentrationen verändert wurden.

Die Versuchsbedingungen der verwendeten Serien sind in der folgenden Liste zusammengestellt:

Serie H: $O_2 - CO_2$ (95 - 5)
$NaHCO_3$ 25 mM
pH, berechnet 7,6
Glukose 5 mM

Serie G: $N_2 - O_2 - CO_2$ (75 - 20 - 5)
$NaHCO_3$ 20 mM
pH, berechnet 7,5
Glukose 5 mM

Serie L: $N_2 - O_2 - CO_2$ (76 - 20 - 4)
$NaHCO_3$ 25 mM
pH, berechnet 7,7
Glukose 5 mM

Serie F: $N_2 - O_2 - CO_2$ (78 - 20 - 2)
$NaHCO_3$ 8 mM
pH, berechnet 7,5
Glukose 5 mM

Serie K: $N_2 - O_2 - CO_2$ (83 - 12 - 5)
$NaHCO_3$ 25 mM
pH, berechnet 7,6
Glukose 5 mM

b) Vor dem Einkippen der Substanzen aus der Birne in den Hauptraum der Reaktionsgefäße wurde einige Zeit der chemisch unbeeinflußte Stoffwechsel in allen Reaktionsgefäßen der Versuche gemessen. In Tabelle 1a. und 1b. sind die Q-Werte dieser Anfangsperioden nicht berücksichtigt; es sind also bei allen Versuchen für „Kontrolle" und „+ Substanz" die Q-Werte der gleichen Zeiträume angegeben und miteinander verglichen worden. Die Gesamtdauer betrug stets zwei Stunden nach Zugabe der Substanzen.

c) Die aerobe Glykolyse der Schnitte aus ödematösem Hirngewebe ist jeweils gegenüber den Schnitten aus der ungeschädigten Hemisphäre beträchtlich erhöht (40).

Tab. 1a. Veränderung der manometrisch gemessenen Glykolyse von Schnitten aus normalem und kältegeschädigtem Kaninchenhirn durch einige Substanzen.

Vers.-Nr.	Substanz	Glykolytische CO_2-Bildung Q_M $\frac{\mu L\ CO_2}{mg\ Trs. \cdot Std.}$				Veränderung %	
		Kontrolle		+ Substanz			
		Normal	Ödematös	Normal	Ödematös	Normal	Ödematös
F 3	NaF 2 mM	1,45	1,75	1,00	1,05	- 31%	- 40%
F 2	NaF 1 mM	1,35	1,90	1,05	1,55	- 22%	- 18%
L 2	Jodessigsäure 1 mM	1,15	1,50	0,45	0,55	- 61%	- 63%
G 9	Glycerinaldehyd 10 mM	1,80	2,85	0,90	0,85	- 50%	- 70%
G 10	Glycerinaldehyd 5 mM	1,70	2,45	0,55	0,95	- 68%	- 61%
K 9	Aescin 0,25 mM	2,95	4,15	2,70	4,05	- 9%	- 2%
L 9	Fumarsäure 5 mM	2,25	3,90	1,30	1,90	- 42%	- 51%

Tab.1b. Veränderung der manometrisch gemessenen Glykolyse von Schnitten aus normalem und kältegeschädigtem Kaninchenhirn durch einige Substanzen.

Vers.-Nr.	Substanz	Glykolytische CO_2-Bildung Q_M $\frac{\mu L\ CO_2}{mg\ Trs. \cdot Std.}$ Kontrolle Normal	Kontrolle Ödematös	+ Substanz Normal	+ Substanz Ödematös	Veränderung % Normal	Veränderung % Ödematös
F 6	2.4-Dinitrophenol 0,1 mM	1,10	1,30	5,50	6,20	+ 400%	+ 377%
F 7	2.4-Dinitrophenol 0,05 mM	1,65	2,20	4,20	5,85	+ 155%	+ 166%
K 7	Strophantin 0,02 mM	2,10	3,25	8,40	7,50	+ 300%	+ 131%
F 10	Buformin 400 µg/ml	1,20	1,65	7,00	6,90	+ 483%	+ 318%
G 11	Buformin 100 µg/ml	1,30	2,35	6,30	8,10	+ 385%	+ 245%
H 1	Buformin 60 µg/ml	1,75	2,30	5,75	7,10	+ 229%	+ 209%
F 9	Buformin 40 µg/ml	1,20	1,95	1,60	2,80	+ 33%	+ 44%
H 3	Buformin 40 µg/ml	1,70	2,15	3,95	4,40	+ 132%	+ 105%
H 2	Buformin 30 µg/ml	1,80	3,20	3,10	4,20	+ 72%	+ 31%

Fortsetzung Tab.1b.

Vers.-Nr.	Substanz	Glykolytische CO_2-Bildung Q_M $\frac{\mu L\ CO_2}{mg\ Trs. \cdot Std.}$ Kontrolle Normal	Kontrolle Ödematös	+ Substanz Normal	+ Substanz Ödematös	Veränderung % Normal	Veränderung % Ödematös
H 11	Amuno 250 µg/ml	1,90	2,70	4,15	5,45	+ 118%	+ 102%
H 9	Amuno 62,5 µg/ml	1,00	2,50	1,45	2,15	+ 45%	- 14%
Tr.18	Etacrynsäure 1 mM	1,65		7,55		+ 358%	
	0,1 mM			1,80		+ 9%	
	0,01 mM			1,95		+ 18%	
Tr.19	Etacrynsäure 1 mM	1,55		7,15		+ 361%	
	0,1 mM			1,80		+ 16%	
Tr.21	Etacrynsäure 1 mM	1,25		10,75		+ 760%	
	0,5 mM			7,00		+ 460%	
	0,1 mM			1,30		+ 4%	
Tr.23	Etacrynsäure 1 mM	1,05		8,20		+ 681%	
	0,8 mM			7,15		+ 581%	
	0,6 mM			8,85		+ 743%	

2. Atmung

Die Tabellen 2a. und 2b. enthalten die Stoffwechselquotienten der Atmung Q_{O_2}, getrennt nach atmungs-hemmenden und atmungs-steigernden Substanzen. Für diese Tabellen gelten ebenfalls die drei vorstehend angegebenen Erläuterungen. Allerdings ist die Atmung der Schnitte aus ödematösem Hirngewebe gegenüber normalem Gehirn nicht so stark gesteigert wie die Glykolyse.

Zur Veranschaulichung des Zeitverlaufes von Glykolyse und Atmung sind in den folgenden Abbildungen die Computer-Ausdrucke einiger charakteristischer Versuche wiedergegeben. Zum Verständnis der Abbildungen folgende Erläuterungen: Die Ausdrucke des Computers sind Gasmengen (μL O_2 bzw. glykolytisches CO_2) bezogen auf 1 mg Hirn-Trockensubstanz. Die Maßstäbe der Ordinate sind abhängig von der absoluten Höhe der X-Werte mit unterschiedlichen Faktoren multipliziert worden. Diese Faktoren sind über jeder Abbildung ausgedruckt. Beispielsweise bedeutet die Angabe „X_M wurde mit dem Faktor 2,0 multipliziert", daß alle ausgedruckten X_M-Werte durch 2,0 zu teilen sind, um die wahren X_M-Werte zu erhalten. Bis zum Zeitpunkt des Kippens sind die Mittelwerte aus Kontrollen und Reaktionsgefäßen mit späterem Substanzzusatz ausgedruckt und durch ein „M" symbolisiert. Nach dem Einkippen der Substanz werden jeweils die Kontrollen durch ein „*" und die Gefäße mit Substanz durch ein „+" dargestellt.

Tab.2a. Veränderung der manometrisch gemessenen Atmung von Schnitten aus normalem und kältegeschädigtem Kaninchenhirn durch einige Substanzen.

Vers.-Nr.	Substanz	Atmung Q_{O_2} $\frac{\mu L\ O_2}{mg\ Trs. \cdot Std.}$ Kontrolle Normal	Kontrolle Ödematös	+ Substanz Normal	+ Substanz Ödematös	Veränderung % Normal	Veränderung % Ödematös
L 2	Jodessigsäure 1 mM	-4,10	-3,75	-3,55	-3,60	- 13%	- 4%
G 9	Glycerinaldehyd 10 mM	-5,00	-4,45	-4,00	-4,00	- 20%	- 10%
G 10	Glycerinaldehyd 5 mM	-4,15	-5,00	-3,80	-4,45	- 8%	- 11%
F 10	Buformin 400 µg/ml	-4,60	-4,80	-2,65	-2,35	- 42%	- 51%
G 11	Buformin 100 µg/ml	-4,80	-4,95	-2,95	-3,25	- 39%	- 34%
H 1	Buformin 60 µg/ml	-5,95	-5,95	-3,75	-3,50	- 37%	- 41%
F 9	Buformin 40 µg/ml	-4,25	-3,90	-3,35	-3,20	- 21%	- 18%
H 3	Buformin 40 µg/ml	-6,30	-6,35	-4,55	-4,40	- 28%	- 31%
H 2	Buformin 30 µg/ml	-5,45	-	-4,50	-	- 17%	-

Fortsetzung Tab. 2a.

Vers.-Nr.	Substanz	Atmung Q_{O_2} $\frac{\mu L\ O_2}{mg\ Trs. \cdot Std.}$ Kontrolle Normal	Kontrolle Ödematös	+ Substanz Normal	+ Substanz Ödematös	Veränderung % Normal	Veränderung % Ödematös
K 9	Aescin 0,25 mM	-4,25	-4,00	-3,15	-2,95	- 26%	- 26%
Tr.18	Etacrynsäure 1 mM	-5,20		-3,65		- 30%	
	Etacrynsäure 0,1 mM			-4,55		- 13%	
	Etacrynsäure 0,01 mM			-4,40		- 15%	
Tr.19	Etacrynsäure 1 mM	-5,00		-3,30		- 34%	
	Etacrynsäure 0,1 mM			-4,65		- 7%	
Tr.21	Etacrynsäure 1 mM	-5,00		-4,00		- 20%	
	Etacrynsäure 0,5 mM			-4,35		- 13%	
	Etacrynsäure 0,1 mM			-4,65		- 7%	
Tr.23	Etacrynsäure 1 mM	-5,65		-3,20		- 43%	
	Etacrynsäure 0,8 mM			-3,65		- 35%	
	Etacrynsäure			-4,30		- 24%	

Tab.2b. Veränderung der manometrisch gemessenen Atmung von Schnitten aus normalem und kältegeschädigtem Kaninchenhirn durch einige Substanzen.

Vers.-Nr.	Substanz	Atmung Q_{O_2} $\frac{\mu L\ O_2}{mg\ Trs. \cdot Std.}$ Kontrolle Normal	Kontrolle Ödematös	+ Substanz Normal	+ Substanz Ödematös	Veränderung % Normal	Veränderung % Ödematös
F 3	NaF 2 mM	-3,95	-4,20	-4,25	-4,70	+ 8%	+ 12%
F 2	NaF 1 mM	-3,60	-3,85	-3,05	-5,30	- 15%	+ 38%
F 6	2.4-Dinitrophenol 0,1 mM	-4,00	-4,30	-7,70	-9,45	+ 93%	+120%
F 7	2.4-Dinitrophenol 0,05 mM	-4,60	-4,70	-7,45	-9,00	+ 62%	+ 92%
K 7	Strophantin 0,02 mM	-4,00	-4,25	-4,65	-5,20	+ 16%	+ 22%
H 11	Amuno 250 µg/ml	-4,25	-5,20	-5,20	-6,20	+ 22%	+ 19%
H 9	Amuno 62,5 µg/ml	-5,00	-5,05	-5,00	-5,50	± 0%	+ 9%

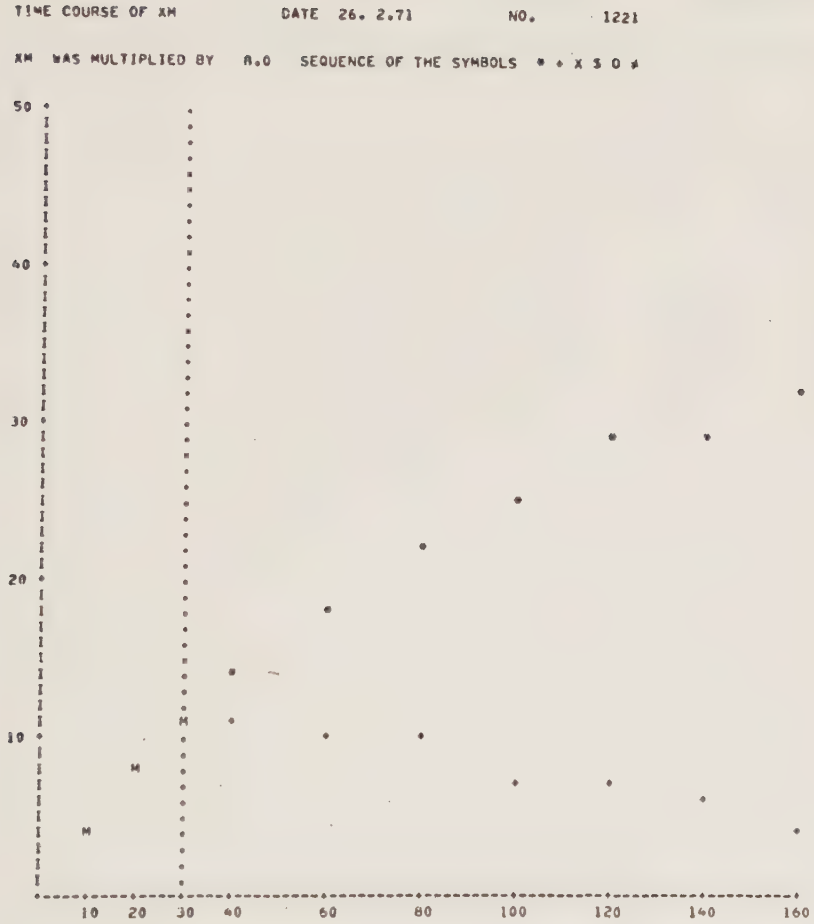

Abb.1a.: Zeitverlauf der aeroben Glykolyse von Schnitten aus normalem Kaninchenhirn.
*: Kontrolle, +: 1 mM Jodessigsäure, zugegeben zur Zeit 30 Minuten.

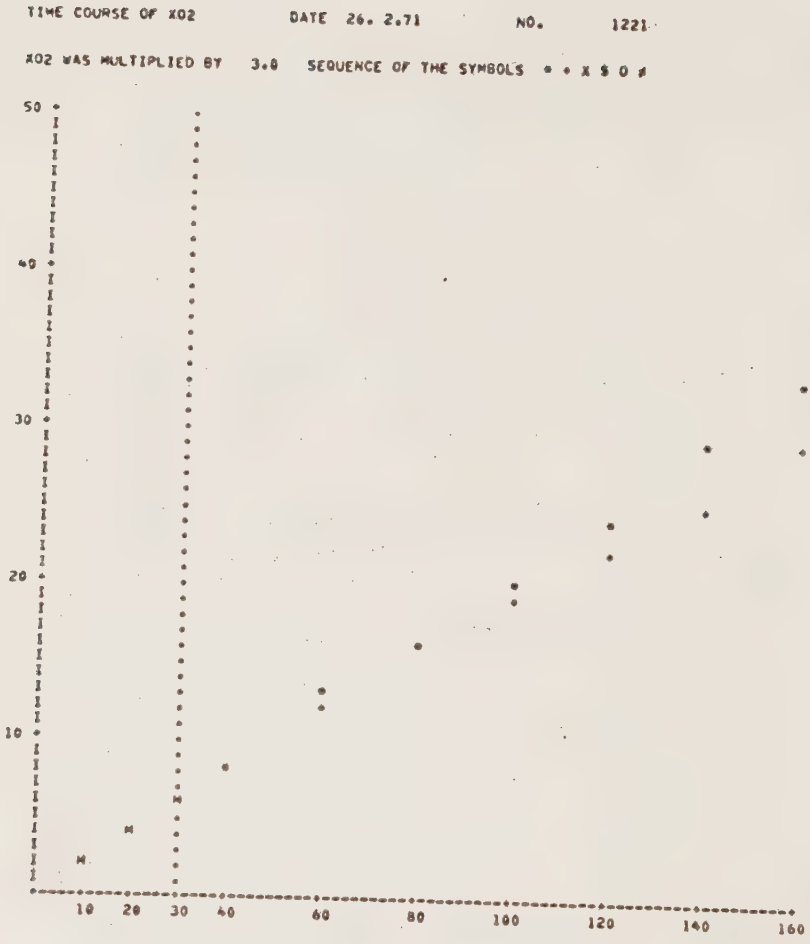

Abb.1b.: Zeitverlauf der Atmung von Schnitten aus normalem Kaninchenhirn.
*: Kontrolle, +: 1 mM Jodessigsäure, zugegeben zur Zeit 30 Minuten.

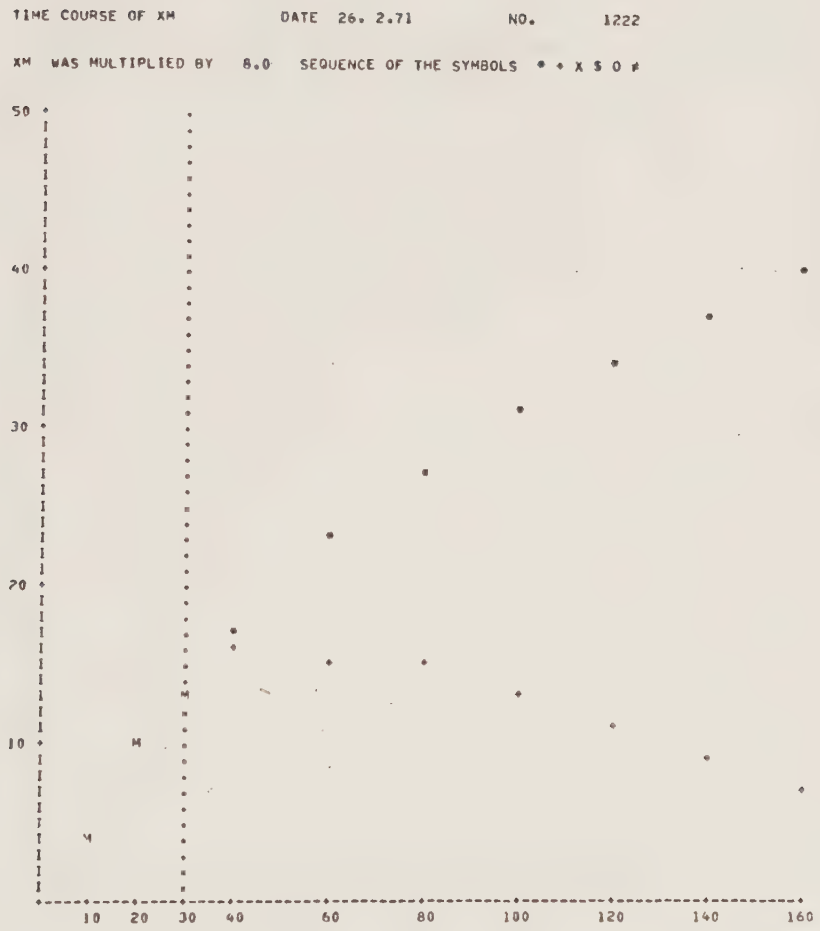

Abb.2a.: Zeitverlauf der aeroben Glykolyse von Schnitten aus kältegeschädigtem Kaninchenhirn.
*: Kontrolle, +: 1 mM Jodessigsäure, zugegeben zur Zeit 30 Minuten.

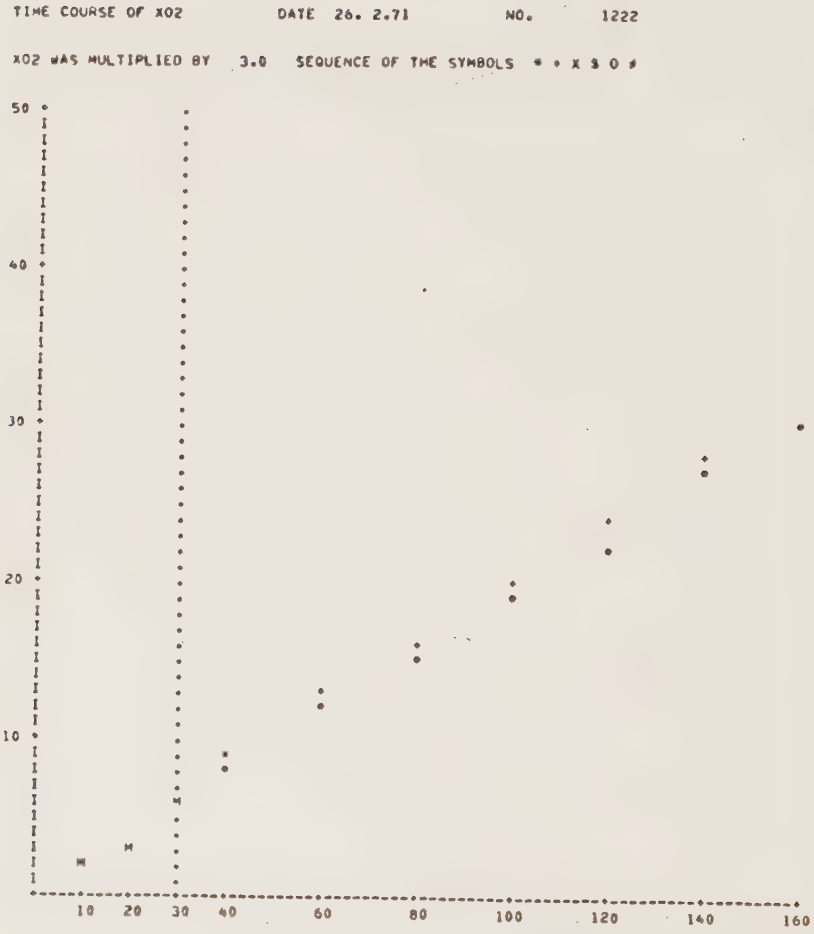

Abb.2b.: Zeitverlauf der Atmung von Schnitten aus kältegeschädigtem Kaninchenhirn.
*: Kontrolle, +: 1 mM Jodessigsäure, zugegeben zur Zeit 30 Minuten.

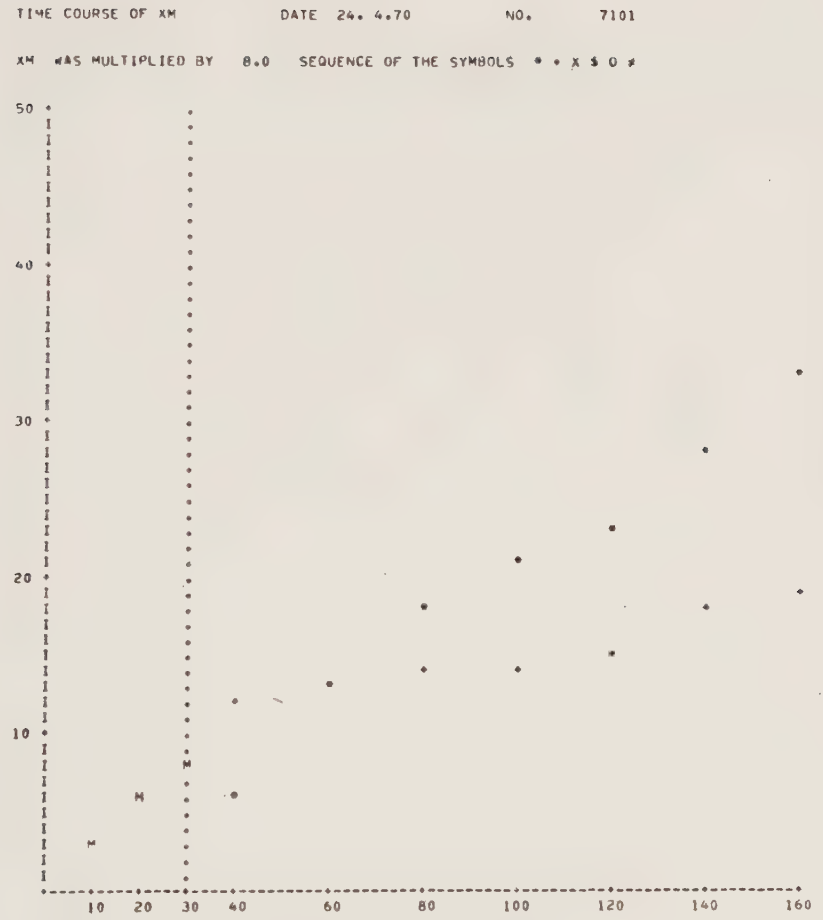

Abb.3a.: Zeitverlauf der aeroben Glykolyse von Schnitten aus normalem Kaninchenhirn.
*: Kontrolle, +: 5 mM Glycerinaldehyd, zugegeben zur Zeit 30 Minuten.

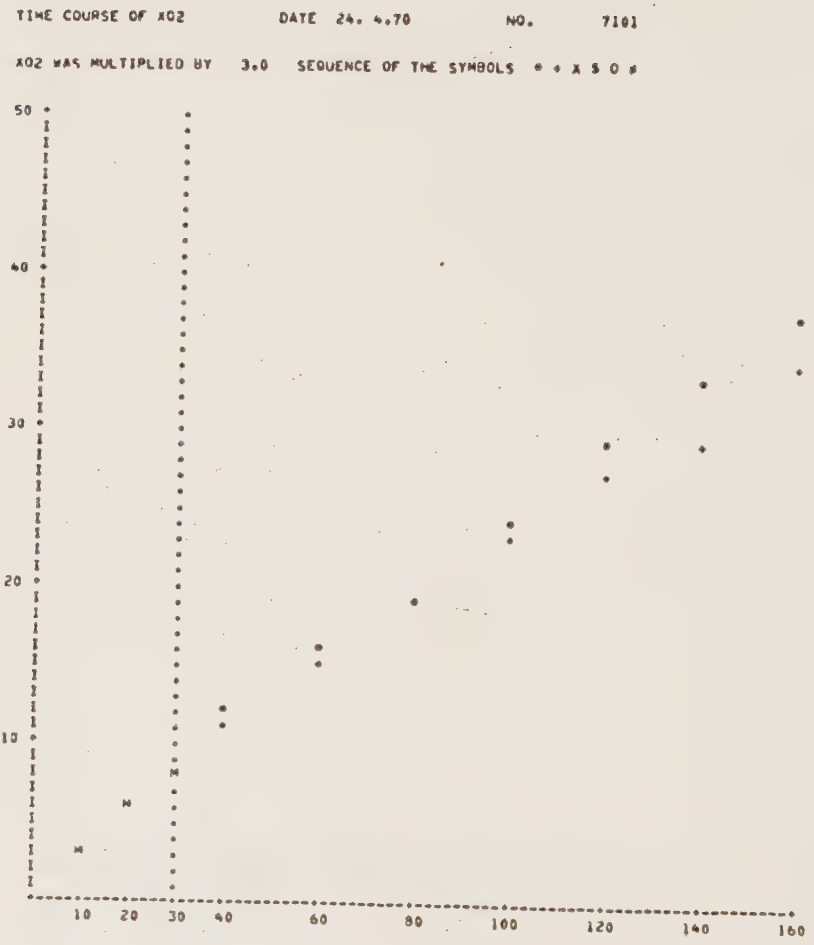

Abb.3b.: Zeitverlauf der Atmung von Schnitten aus normalem Kaninchenhirn.
*: Kontrolle, +: 5 mM Glycerinaldehyd, zugegeben zur Zeit 30 Minuten.

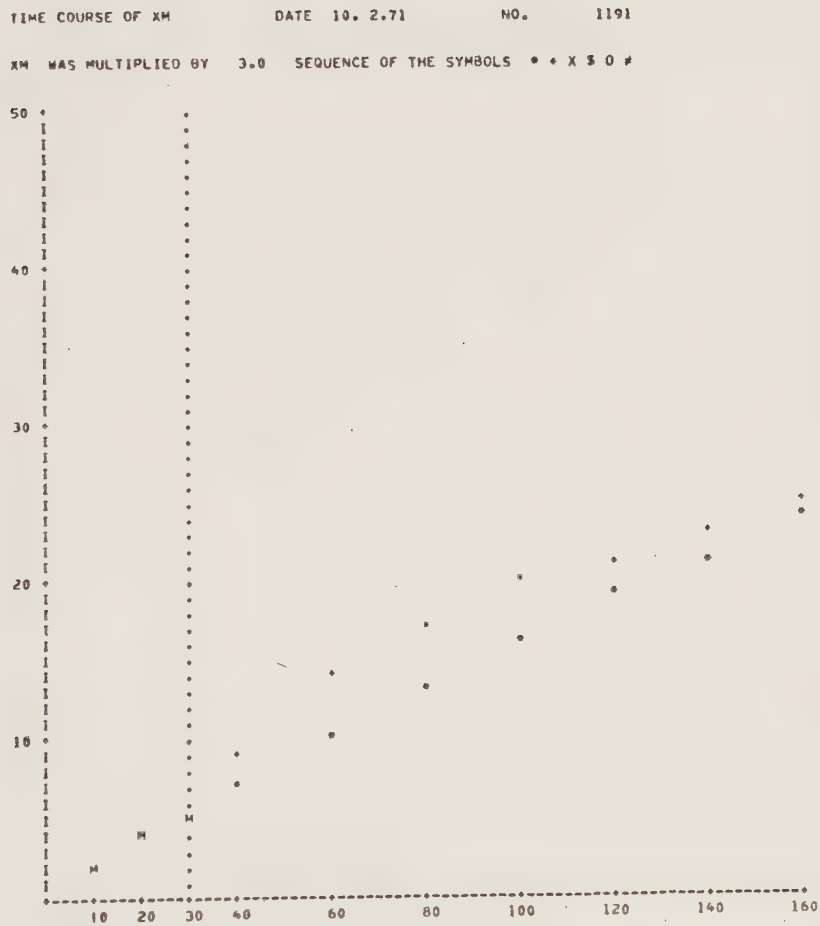

Abb.4a.: Zeitverlauf der aeroben Glykolyse von Schnitten aus normalem Kaninchenhirn.
*: Kontrolle, +: 0,25 mM Aescin, zugegeben zur Zeit 30 Minuten.

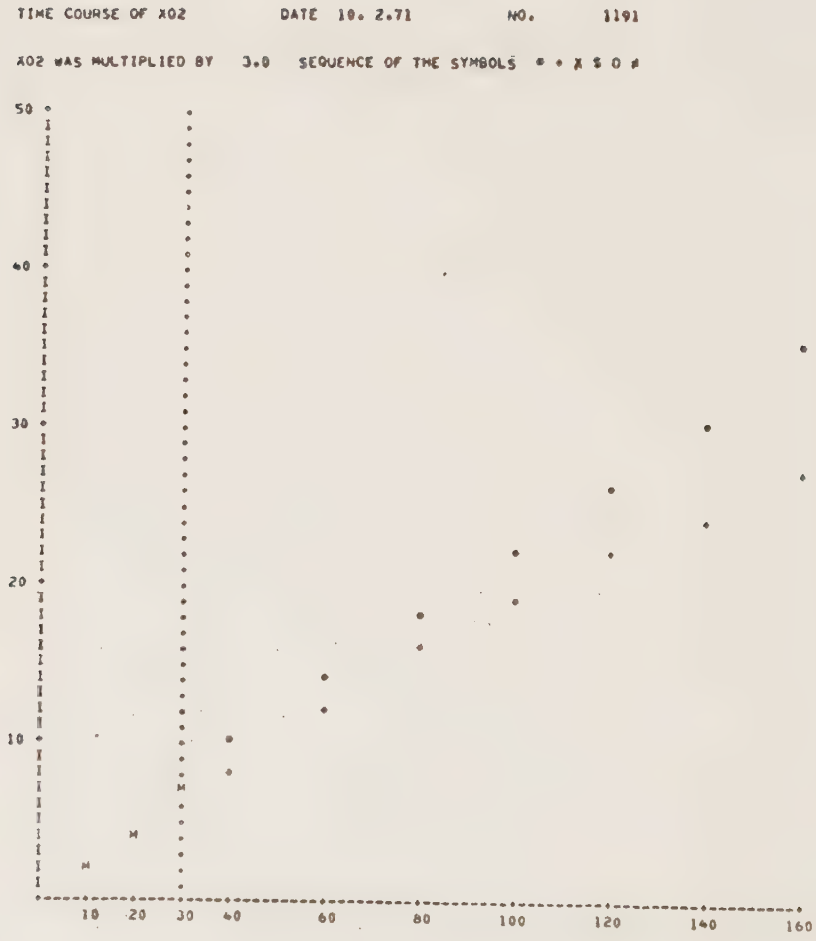

Abb.4b.: Zeitverlauf der Atmung von Schnitten aus normalem Kaninchenhirn.
*: Kontrolle, +: 0,25 mM Aescin, zugegeben zur Zeit 30 Minuten.

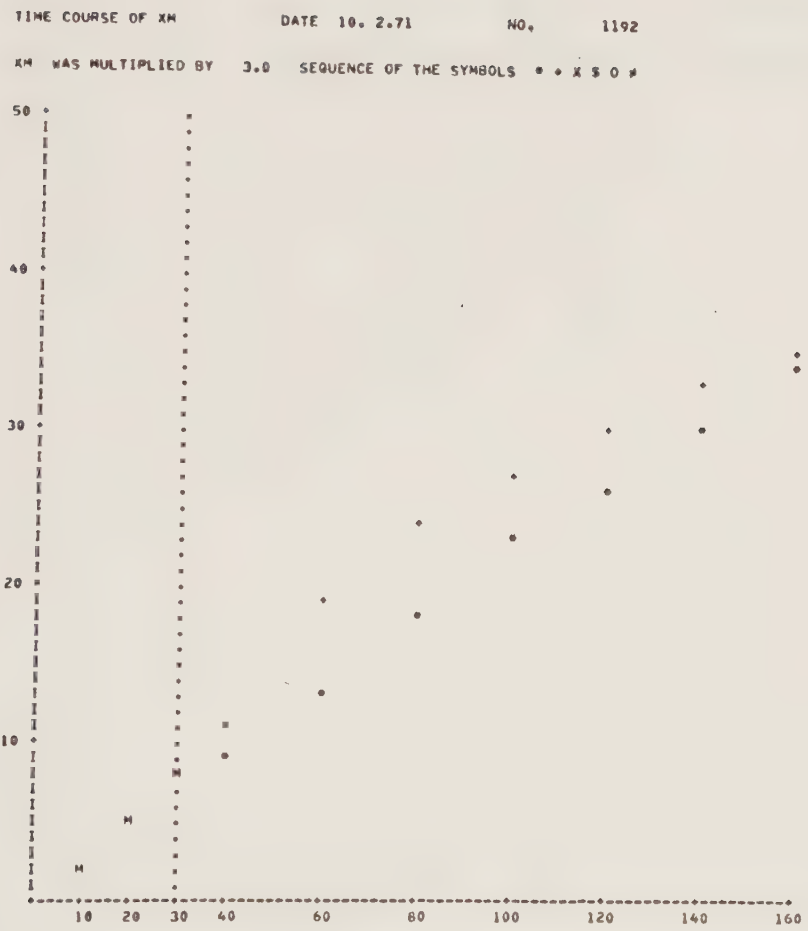

Abb.5a.: Zeitverlauf der aeroben Glykolyse von Schnitten aus kältegeschädigtem Kaninchenhirn.
*: Kontrolle, +: 0,25 mM Aescin, zugegeben zur Zeit 30 Minuten.

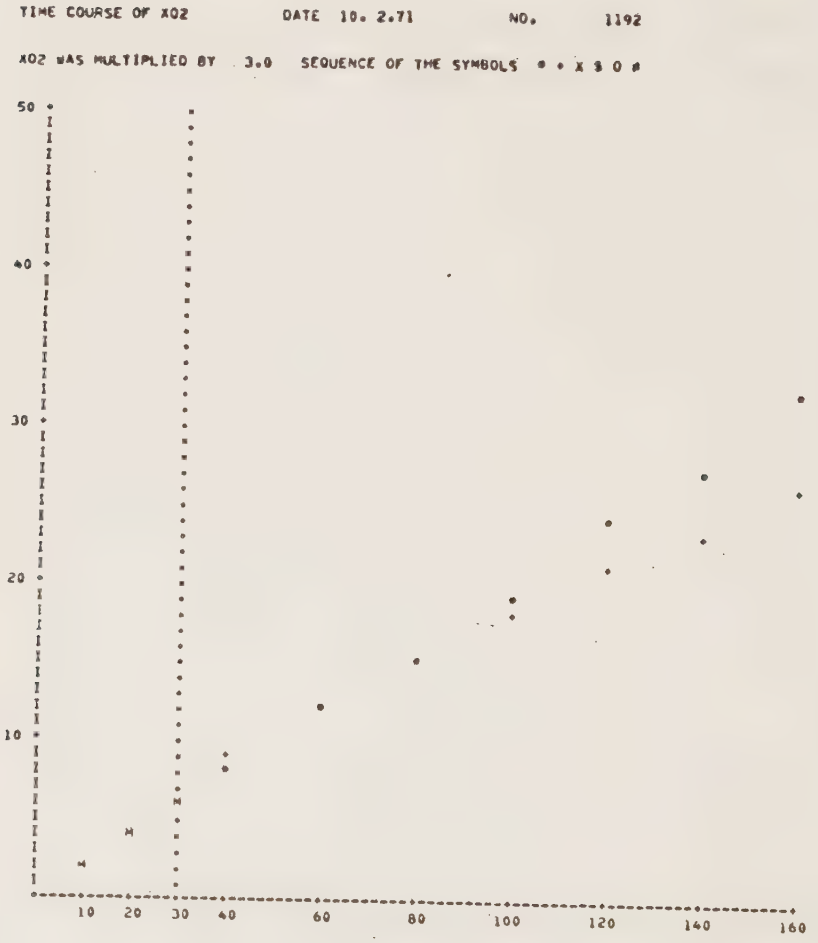

Abb.5b.: Zeitverlauf der Atmung von Schnitten aus kältegeschädigtem Kaninchenhirn.
*: Kontrolle, +: 0,25 mM Aescin, zugegeben zur Zeit 30 Minuten.

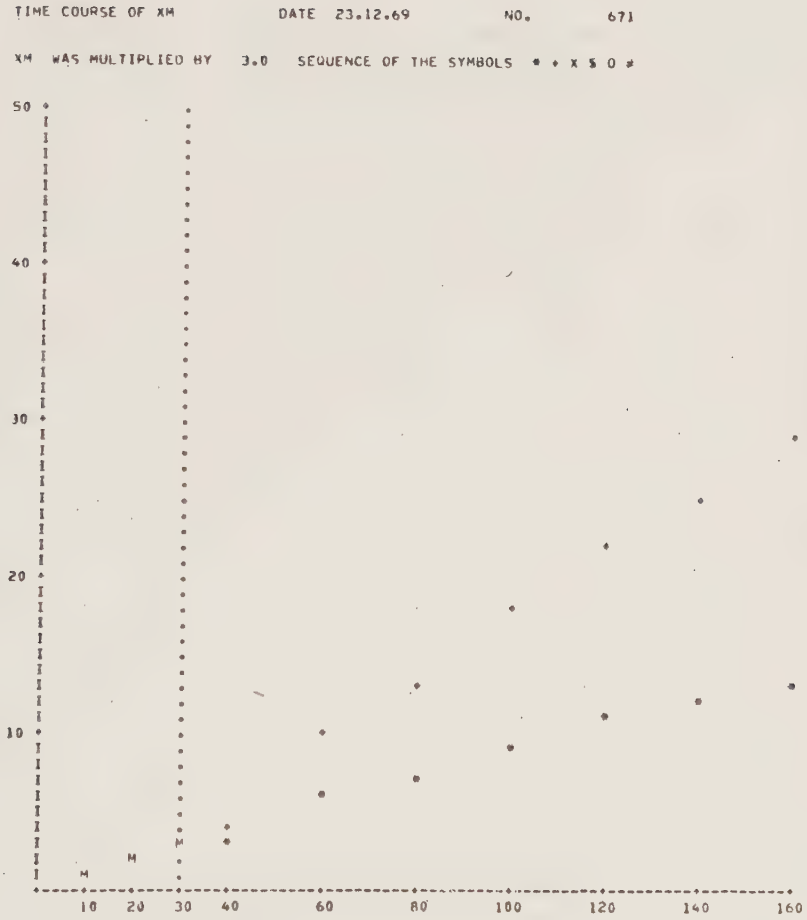

Abb.6a.: Zeitverlauf der aeroben Glykolyse von Schnitten aus normalem Kaninchenhirn.
*: Kontrolle, +: 0,05 mM 2,4-Dinitrophenol, zugegeben zur Zeit 30 Minuten.

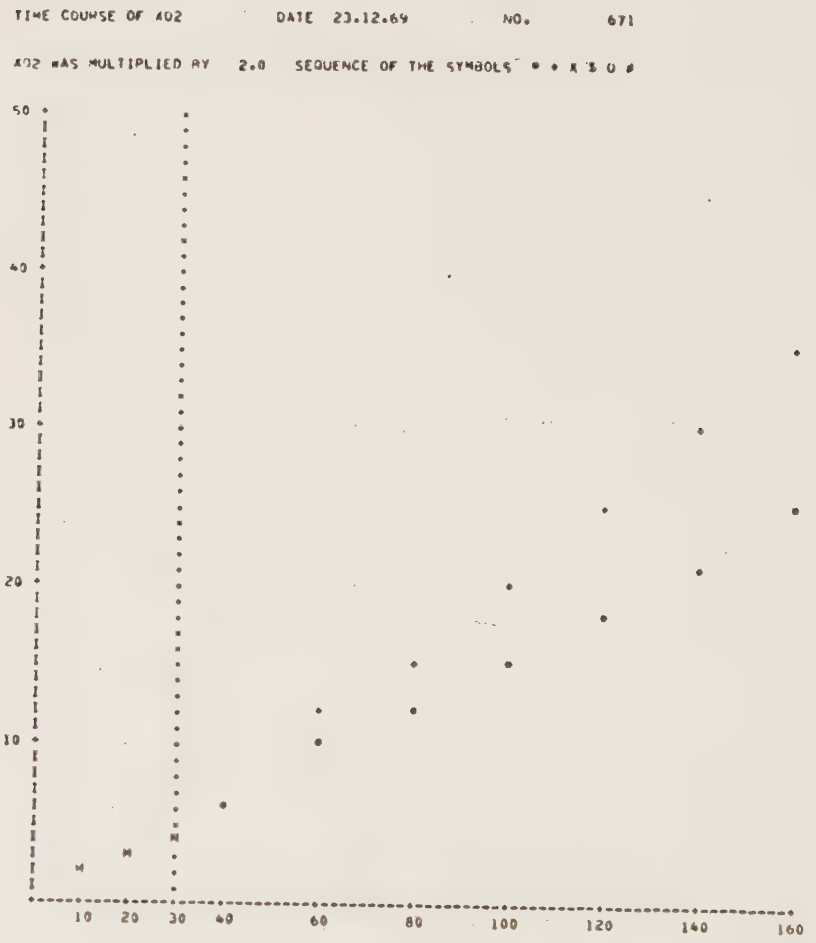

Abb.6b.: Zeitverlauf der Atmung von Schnitten aus normalem Kaninchenhirn.
*: Kontrolle, +: 0,05 mM 2,4-Dinitrophenol, zugegeben zur Zeit 30 Minuten.

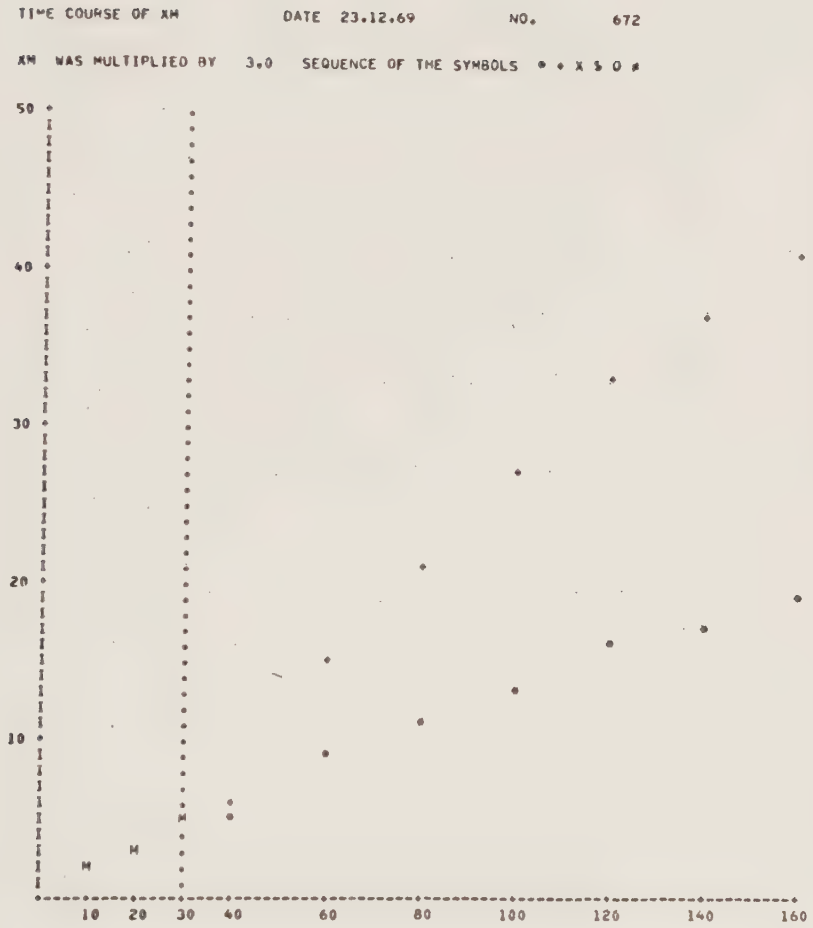

Abb.7a.: Zeitverlauf der aeroben Glykolyse von Schnitten aus kältegeschädigtem Kaninchenhirn.
*: Kontrolle, +: 0,05 mM 2,4-Dinitrophenol, zugegeben zur Zeit 30 Minuten.

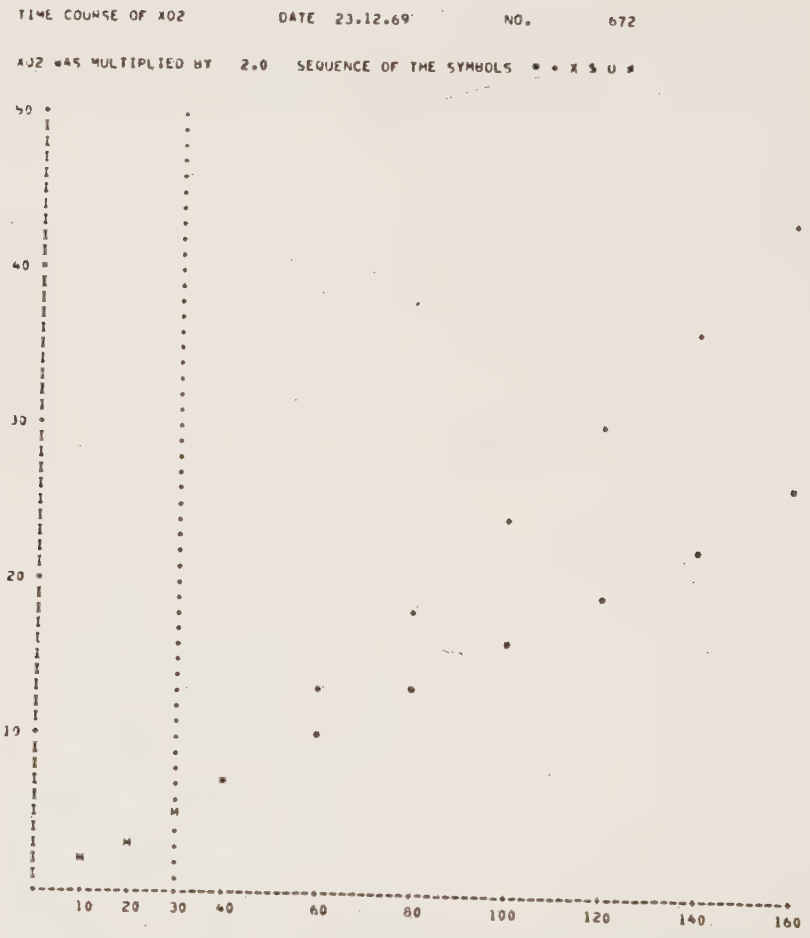

Abb.7b.: Zeitverlauf der Atmung von Schnitten aus kältegeschädigtem Kaninchenhirn.
*: Kontrolle, +: 0,05 mM 2,4-Dinitrophenol, zugegeben zur Zeit 30 Minuten.

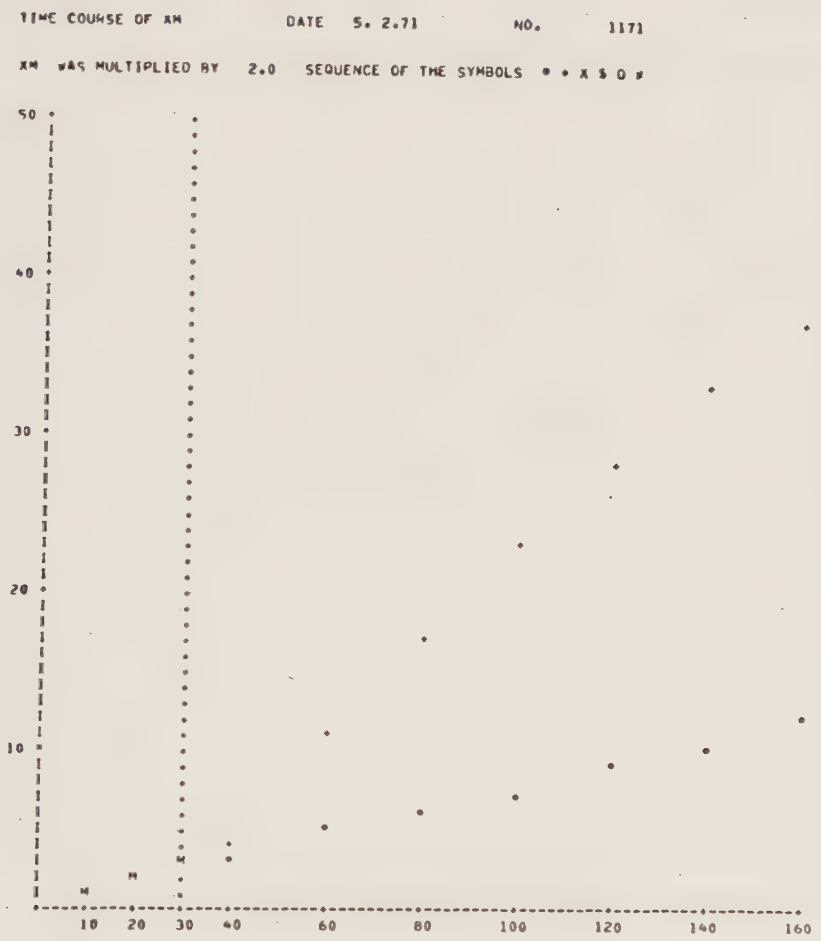

Abb.8a.: Zeitverlauf der aeroben Glykolyse von Schnitten aus normalem Kaninchenhirn.
*: Kontrolle, +: 0,02 mM Strophanthin, zugegeben zur Zeit 30 Minuten.

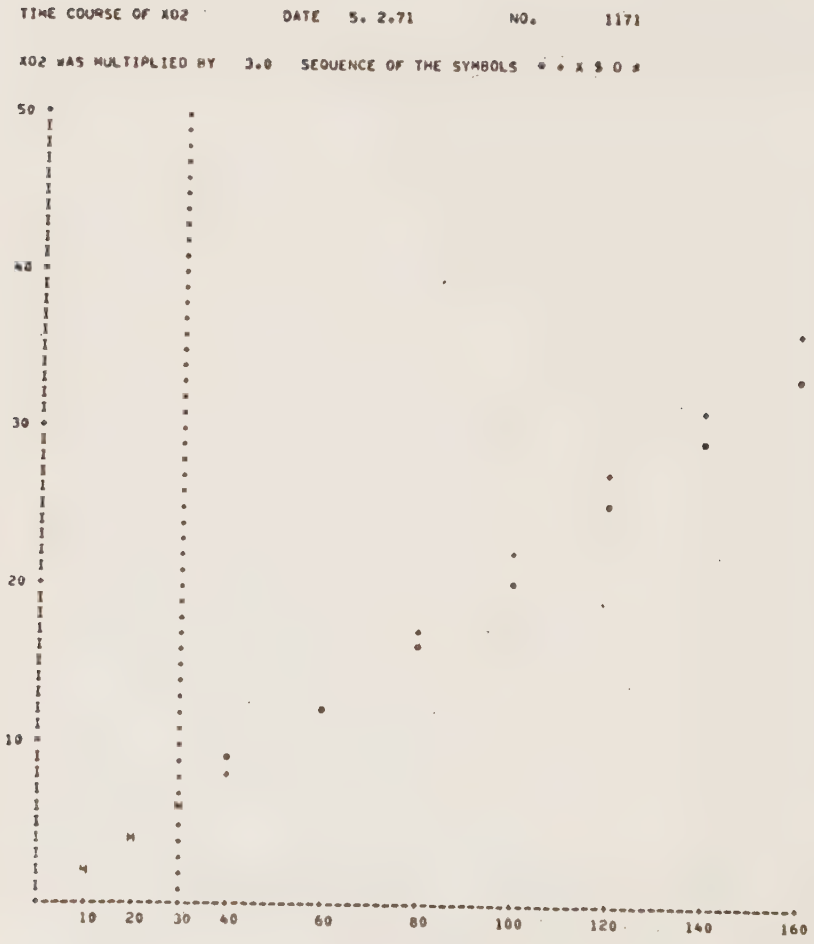

Abb.8b.: Zeitverlauf der Atmung von Schnitten aus normalem Kaninchenhirn.
*: Kontrolle, +: 0,02 mM Strophanthin, zugegeben zur Zeit 30 Minuten.

Abb.9a.: Zeitverlauf der aeroben Glykolyse von Schnitten aus normalem Kaninchenhirn.
*: Kontrolle, +: 40 µg/ml Buformin, zugegeben zur Zeit 30 Minuten.

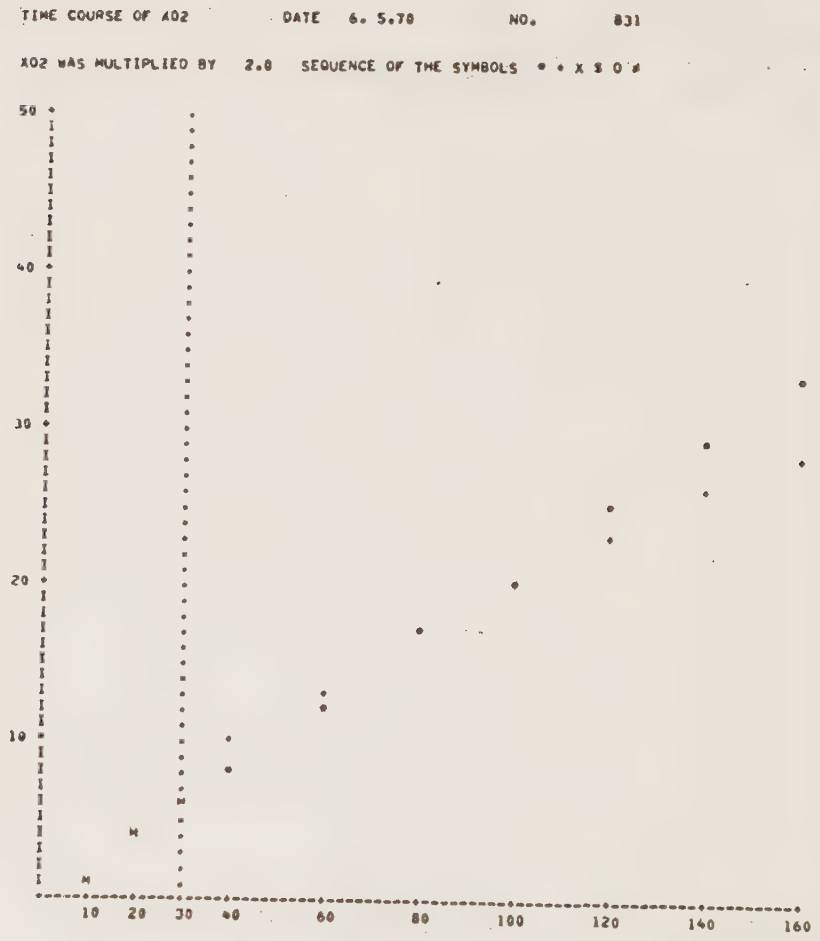

Abb.9b.: Zeitverlauf der Atmung von Schnitten aus normalem Kaninchenhirn.
*: Kontrolle, +: 40 µg/ml Buformin, zugegeben zur Zeit 30 Minuten.

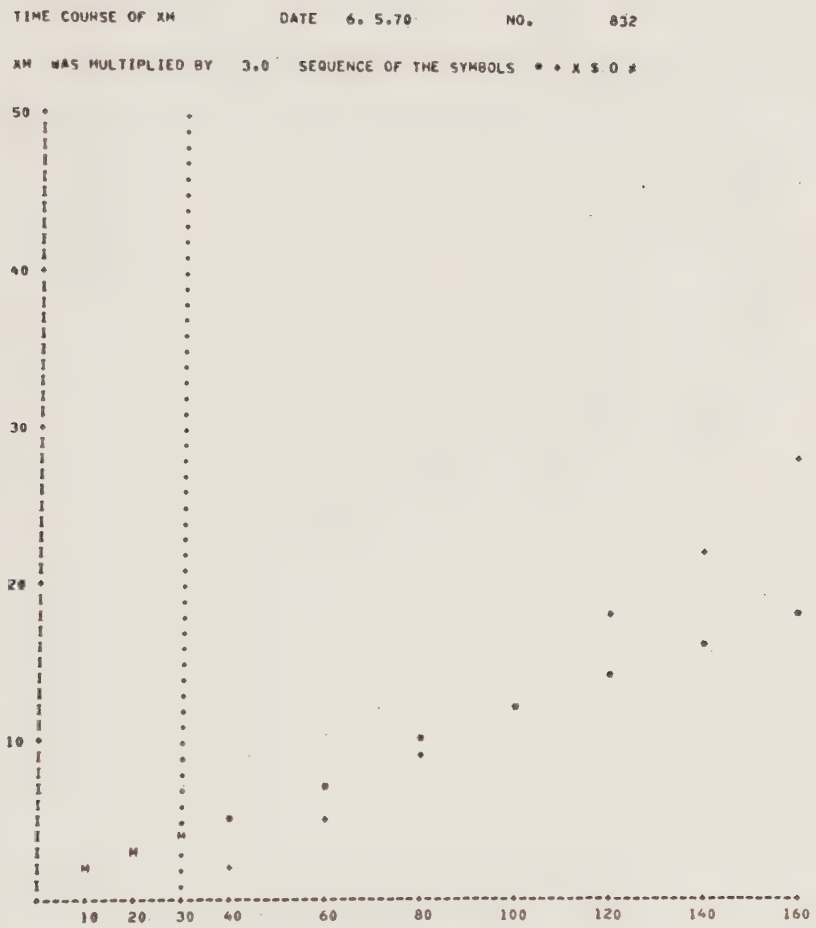

Abb.10a.: Zeitverlauf der aeroben Glykolyse von Schnitten aus kältegeschädigtem Kaninchenhirn.
*: Kontrolle, +: 40 µg/ml Buformin, zugegeben zur Zeit 30 Minuten.

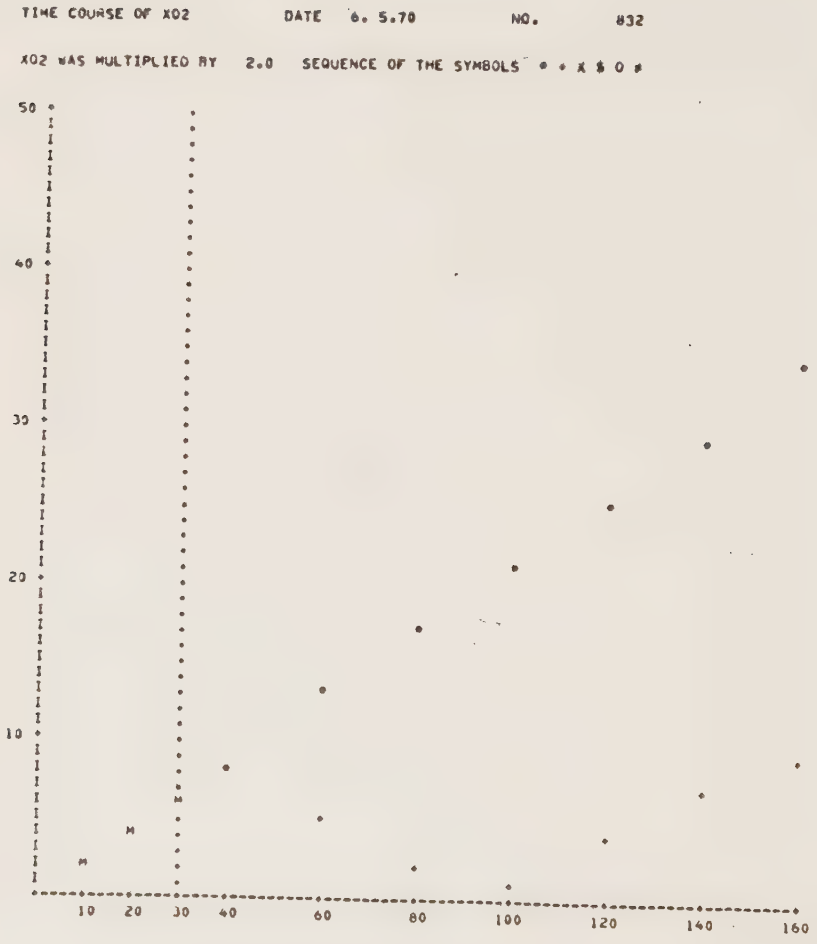

Abb.10b.: Zeitverlauf der Atmung von Schnitten aus kältegeschädigtem Kaninchenhirn.
*: Kontrolle, +: 40 µg/ml Buformin, zugegeben zur Zeit 30 Minuten.

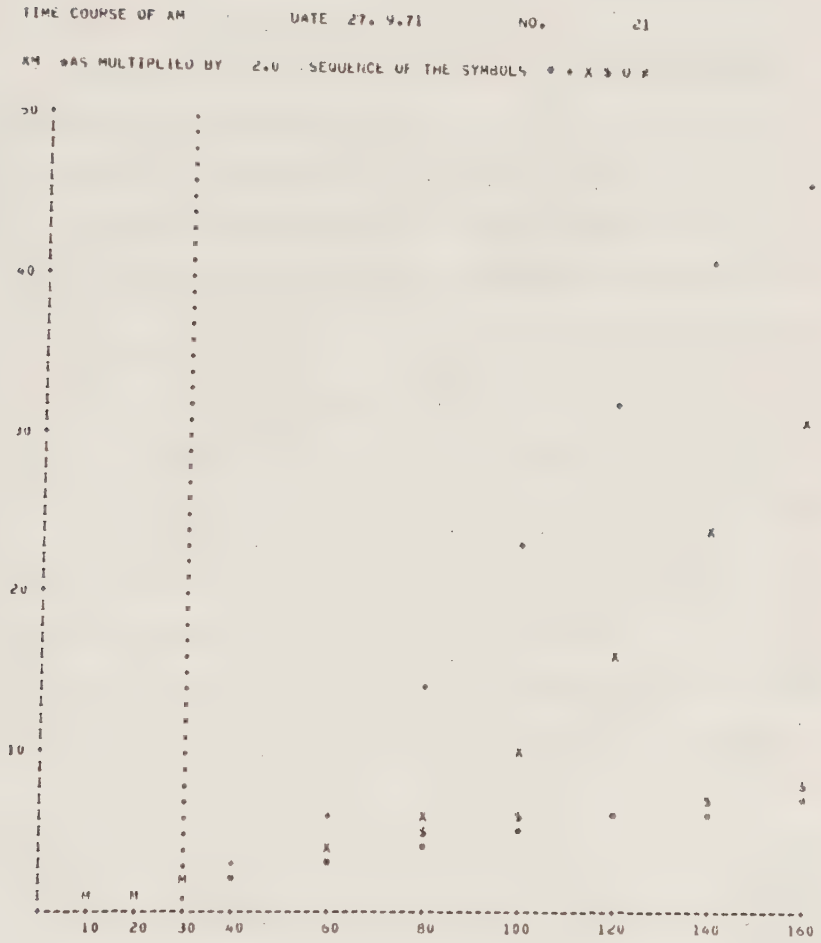

Abb.11a.: Zeitverlauf der aeroben Glykolyse von Schnitten aus normalem Kaninchenhirn.
*: Kontrolle, +: 1 mM Etacrynsäure, X: 0,5 mM Etacrynsäure, $: 0,1 mM Etacrynsäure, zugegeben zur Zeit 30 Minuten.

3. Glukose-Verbrauch (Tabellen 3a. und 3b.)

4. Laktat-Bildung (Tabellen 4a. und 4b.)

5. Pyruvat-Bildung (Tabellen 5a. und 5b.)

In den folgenden Tabellen 3, 4 und 5 sind der Glukose-Verbrauch und die Bildung von Laktat und Pyruvat für die Versuche aus den Tabellen 1 und 2 angegeben. Die prozentuale Veränderung des Stoffwechsels unter dem Einfluß zugesetzter Substanzen ist jeweils in den letzten beiden Spalten aufgeführt. Hierzu folgende Erklärung: Die Substanzen wirkten in allen Versuchen nur während der letzten 130 Minuten auf den Stoffwechsel der Schnitte ein. Bei allen Versuchen wurde am Beginn 1 bis 2 Stunden lang unbeeinflußter Stoffwechsel gemessen. Dieser anfängliche Teil der Versuche bringt also keinen Unterschied im Substrat-Verbrauch bzw. in der Substrat-Bildung. Folglich sind die wirklichen Effekte der verwendeten Substanzen größer als es zunächst bei der Auswertung der chemischen Bestimmungen den Anschein hat. Hierzu ein Rechenbeispiel: Laktat-Bildung, Versuch F 2, „Normal":

Kontrolle: In 220 Minuten 39,2 µg Laktat/mg Trs. gebildet.
+ 1mM NaF: In 220 Minuten 34,8 µg Laktat/mg Trs. gebildet.
Differenz: 39,2 µg - 34,8 µg = 4,4 µg Laktat/mg Trs..

Diese Erniedrigung um 4,4 µg Laktat/mg Trs. kam durch 130 Minuten andauernde Einwirkung von 1mM NaF zustande.
Erniedrigung der Laktat-Bildung in 60 Minuten: $\frac{4,4 \cdot 60}{130}$ = 2,0 µg/mg Trs..
Laktat-Bildung der Kontrolle in 60 Minuten: $\frac{39,2 \cdot 60}{220}$ = 10,7 µg/mg Trs..

Bei 10,7 µg Laktat-Bildung ist die Erniedrigung 2,0 µg, bei 100,0 µg Laktat-Bildung ist die Erniedrigung $\frac{2 \cdot 100}{10,7}$ = 19%.

So erklärt sich die Hemmung um 19%, die in der vorletzten Spalte von Tabelle 4a. bei Versuch F 2 angegeben ist.

Zwecks besserer Übersicht sind in den Tabellen 3, 4 und 5 lediglich die auf 60 Minuten umgerechneten Substrat-Umsätze aufgeführt. Die Berechnung der prozentualen Hemmung oder Steigerung erfolgte stets nach dem vorgenannten Beispiel.

Tab.3a. Veränderung des Glucose-Verbrauchs von Schnitten aus normalem und kältegeschädigtem Kaninchenhirn durch einige Substanzen.

Vers.-Nr.	Substanz	Glucose-Verbrauch µg / mg Trs. · Std.				Veränderung %	
		Kontrolle		+ Substanz			
		Normal	Ödematös	Normal	Ödematös	Normal	Ödematös
F 3	NaF 2 mM	14,0 ±0,0	16,9 ±0,3	13,5 ±0,3	15,0 ±0,1	- 6%	- 19%
F 2	NaF 1 mM	14,9 ±0,4	17,3 ±0,1	13,9 ±1,1	22,0 ±4,9	- 11%	+ 46%
L 2	Jodessigsäure 1 mM	15,2 ±0,6	18,3 ±0,9	8,8 ±0,4	10,7 ±1,1	- 69%	- 69%
G 9	Glycerinaldehyd 10 mM	18,7 ±1,4	23,2 ±0,5	11,7 ±0,5	12,1 ±0,5	- 63%	- 81%
G 10	Glycerinaldehyd 5 mM	18,1 ±0,1	20,7 ±0,7	9,8 ±0,1	11,1 ±0,1	- 76%	- 77%
K 9	Aescin 0,25 mM	22,7 ±0,1	28,2 ±0,3	20,4 ±1,2	26,1 ±2,1	- 17%	- 12%
K 10	Aescin 0,1 mM	18,8 ±0,5	21,2 ±2,6	17,9 ±0,5	19,0 ±1,4	- 9%	- 17%
L 9	Fumarsäure 5 mM	21,7 ±0,5	27,1 ±0,5	16,0 ±0,1	21,4 ±0,2	- 44%	- 36%

Fortsetzung Tab.3a.

Vers.-Nr.	Substanz	Glucose-Verbrauch µg / mg Trs. · Std.		Veränderung %	
		Kontrolle	+ Substanz		
		Normal Ödematös	Normal Ödematös	Normal	Ödematös
Tr. 18	Etacrynsäure 0,1 mM	19,5 ±0,3	17,3 ±0,7	- 18%	
	Etacrynsäure 0,01 mM		18,5 ±0,0	- 8%	
Tr. 19	Etacrynsäure 0,1 mM	19,3 ±0,1	17,3 ±0,8	- 17%	
Tr. 21	Etacrynsäure 0,1 mM	17,9 ±0,9	16,5 ±0,4	- 13%	

Tab.3b. Veränderung des Glucose-Verbrauchs von Schnitten aus normalem und kältegeschädigtem Kaninchenhirn durch einige Substanzen.

Vers.-Nr.	Substanz	Glucose-Verbrauch $\frac{\mu g}{mg\ Trs. \cdot Std.}$ Kontrolle Normal	Kontrolle Ödematös	+ Substanz Normal	+ Substanz Ödematös	Veränderung % Normal	Veränderung % Ödematös
F 6	2.4-Dinitrophenol 0,1 mM	17,2 ±0,1	19,7 ±0,5	34,0 ±0,4	38,0 ±2,8	+ 173%	+ 164%
F 7	2.4-Dinitrophenol 0,05 mM	15,7 ±1,3	19,2 ±0,4	24,7 ±0,1	33,0 ±0,3	+ 97%	+ 122%
K 7	Strophantin 0,02 mM	20,0 ±0,9	23,8 ±1,6	33,4 ±2,6	33,8 ±0,8	+ 111%	+ 69%
F 10	Buformin 400 µg/ml	17,5 ±2,0	19,7 ±1,7	32,0 ±0,2	34,7 ±0,3	+ 143%	+ 132%
G 11	Buformin 100 µg/ml	16,5 ±0,3	22,2 ±0,3	30,9 ±1,6	37,5 ±1,3	+ 144%	+ 114%
H 1	Buformin 60 µg/ml	17,6 ±1,5	19,7 ±0,6	28,7 ±0,9	34,1 ±0,6	+ 104%	+ 121%
F 9	Buformin 40 µg/ml	15,1 ±1,3	18,2 ±0,3	17,4 ±1,0	21,6 ±1,1	+ 26%	+ 32%
H 3	Buformin 40 µg/ml	18,5 ±1,7	21,0 ±1,0	26,7 ±1,3	29,1 ±1,6	+ 77%	+ 67%
H 2	Buformin 30 µg/ml	16,3 ±0,4	24,2 ±0,8	20,3 ±0,1	27,4 ±1,6	+ 41%	+ 22%

Fortsetzung Tab.3b.

Vers.-Nr.	Substanz	Glucose-Verbrauch $\frac{\mu g}{mg\ Trs. \cdot Std.}$ Kontrolle Normal	Kontrolle Ödematös	+ Substanz Normal	+ Substanz Ödematös	Veränderung % Normal	Veränderung % Ödematös
H 11	Amuno 250 µg/ml	15,5 ±1,6	21,2 ±1,1	27,2 ±1,3	36,5 ±0,1	+ 125%	+ 119%
H 9	Amuno 62,5 µg/ml	12,6 ±1,1	18,0 ±0,6	15,4 ±0,7	21,3 ±2,4	+ 38%	+ 32%
Tr.18	Etacrynsäure 1 mM	19,5 ±0,3		31,9 ±0,0		+ 103%	
Tr.19	Etacrynsäure 1 mM	19,3 ±0,1		31,9 ±0,9		+ 105%	
Tr.21	Etacrynsäure 1 mM	17,9 ±0,9		35,8 ±5,7		+ 166%	
	Etacrynsäure 0,5 mM			29,9 ±1,5		+ 111%	

Tab.4a. Veränderung der Lactat-Bildung von Schnitten aus normalem und kältegeschädigtem Kaninchenhirn durch einige Substanzen.

Vers.-Nr.	Substanz	Lactat-Bildung µg / mg Trs. · Std.				Veränderung %	
		Kontrolle		+ Substanz			
		Normal	Ödematös	Normal	Ödematös	Normal	Ödematös
F 3	NaF 2 mM	3,6 ±0,1	4,7 ±0,2	3,6 ±0,1	4,4 ±0,0	+ 1%	- 13%
F 2	NaF 1 mM	10,7 ±0,8	13,2 ±0,7	9,5 ±0,1	12,4 ±0,5	- 19%	- 11%
L 2	Jodessigsäure 1 mM	10,2 ±0,9	14,0 ±1,4	6,4 ±0,1	8,2 ±0,1	- 62%	- 69%
G 9	Glycerinaldehyd 10 mM	13,4 ±1,4	18,4 ±0,4	9,7 ±0,3	13,0 ±0,6	- 46%	- 50%
G 10	Glycerinaldehyd 5 mM	12,4 ±0,4	15,5 ±1,0	7,9 ±0,1	10,4 ±0,6	- 60%	- 54%
L 9	Fumarsäure 5 mM	15,8 ±0,2	20,6 ±0,5	13,7 ±0,7	18,0 ±0,8	- 22%	- 21%
Tr.18	Etacrynsäure 0,1 mM	14,0 ±1,1		12,8 ±0,5		- 14%	
	Etacrynsäure 0,01 mM			13,6 ±0,3		- 5%	
Tr.19	Etacrynsäure 0,1 mM	13,9 ±0,1		13,3 ±0,6		- 7%	
Tr.21	Etacrynsäure 0,1 mM	13,0 ±0,4		12,4 ±0,1		- 7%	

Tab.4b. Veränderung der Lactat-Bildung von Schnitten aus normalem und kältegeschädigtem Kaninchenhirn durch einige Substanzen.

Vers.-Nr.	Substanz	Lactat-Bildung µg / mg Trs. · Std.				Veränderung %	
		Kontrolle		+ Substanz			
		Normal	Ödematös	Normal	Ödematös	Normal	Ödematös
F 6	2.4-Dinitrophenol 0,1 mM	11,8 ±0,0	14,3 ±0,9	22,5 ±0,4	25,6 ±1,8	+ 161%	+ 140%
F 7	2.4-Dinitrophenol 0,05 mM	11,9 ±1,0	15,5 ±0,8	17,5 ±0,7	24,8 ±0,2	+ 80%	+ 102%
K 7	Strophantin 0,02 mM	14,7 ±0,7	17,9 ±1,1	26,1 ±2,1	25,2 ±0,9	+ 129%	+ 68%
F 10	Buformin 400 µg/ml	9,8 ±0,5	14,4 ±1,3	26,1 ±0,6	29,5 ±0,2	+ 289%	+ 182%
G 11	Buformin 100 µg/ml	11,7 ±0,4	18,1 ±0,1	25,4 ±1,9	32,9 ±0,5	+ 195%	+ 135%
H 1	Buformin 60 µg/ml	11,7 ±1,6	14,3 ±0,5	22,1 ±1,5	26,7 ±0,7	+ 146%	+ 143%
F 9	Buformin 40 µg/ml	10,8 ±0,7	14,1 ±0,7	13,0 ±0,9	16,4 ±0,6	+ 35%	+ 28%
H 3	Buformin 40 µg/ml	11,6 ±1,0	14,3 ±0,7	18,0 ±1,6	21,3 ±1,3	+ 95%	+ 85%
H 2	Buformin 30 µg/ml	10,0 ±0,3	16,2 ±0,6	14,0 ±0,1	20,0 ±1,3	+ 66%	+ 38%

Fortsetzung Tab.4b.

Vers.-Nr.	Substanz	Lactat-Bildung µg / mg Trs. · Std.				Veränderung %	
		Kontrolle		+ Substanz			
		Normal	Ödematös	Normal	Ödematös	Normal	Ödematös
H 11	Amuno 250 µg/ml	11,4 ±0,2	16,7 ±0,2	18,5 ±1,1	27,2 ±1,8	+ 103%	+ 104%
H 9	Amuno 62,5 µg/ml	6,6 ±0,9	11,9 ±0,9	9,4 ±0,7	10,9 ±1,8	+ 72%	- 15%
Tr.18	Etacrynsäure 1 mM	14,0 ±1,1		27,9 ±0,6		+ 160%	
Tr.19	Etacrynsäure 1 mM	13,9 ±0,1		27,7 ±0,7		+ 160%	
Tr.21	Etacrynsäure 1 mM	13,0 ±0,4		31,4 ±5,2		+ 234%	
	Etacrynsäure 0,5 mM			24,8 ±1,7		+ 151%	

Tab.5a. Veränderung der Pyruvat-Bildung von Schnitten aus normalem und kältegeschädigtem Kaninchenhirn durch einige Substanzen.

Vers.-Nr.	Substanz	Pyruvat-Bildung µg / mg Trs. · Std.				Veränderung %	
		Kontrolle		+ Substanz			
		Normal	Ödematös	Normal	Ödematös	Normal	Ödematös
F 3	NaF 2 mM	0,46 ±0,08	0,60 ±0,05	0,35 ±0,03	0,44 ±0,03	- 40%	- 46%
F 2	NaF 1 mM	0,38 ±0,03	0,52 ±0,08	0,35 ±0,03	0,46 ±0,03	- 12%	- 18%
L 2	Jodessigsäure 1 mM	0,50 ±0,03	0,67 ±0,08	0,33 ±0,03	0,50 ±0,03	- 55%	- 41%
G 9	Glycerinaldehyd 10 mM	0,68 ±0,14	1,09 ±0,11	0,27 ±0,05	0,41 ±0,03	- 102%	- 106%
G 10	Glycerinaldehyd 5 mM	0,67 ±0,08	0,98 ±0,20	0,31 ±0,03	0,45 ±0,03	- 90%	- 89%
K 7	Strophantin 0,02 mM	0,67 ±0,14	0,89 ±0,17	0,31 ±0,00	0,33 ±0,06	- 90%	- 104%
K 9	Aescin 0,25 mM	0,56 ±0,14	0,64 ±0,03	0,33 ±0,03	0,33 ±0,03	- 66%	- 79%
K 10	Aescin 0,1 mM	0,61 ±0,14	0,70 ±0,17	0,36 ±0,08	0,47 ±0,03	- 68%	- 53%

Fortsetzung Tab.5a.

Vers.-Nr.	Substanz	Pyruvat-Bildung µg / mg Trs. · Std.				Veränderung %	
		Kontrolle		+ Substanz			
		Normal	Ödematös	Normal	Ödematös	Normal	Ödematös
Tr.18	Etacrynsäure 0,1 mM	0,66 ±0,09		0,43 ±0,06		- 56%	
	Etacrynsäure 0,01 mM			0,66 ±0,17		0%	
Tr.19	Etacrynsäure 0,1 mM	0,86 ±0,03		0,57 ±0,09		- 54%	
Tr.21	Etacrynsäure 0,1 mM	0,70 ±0,11		0,56 ±0,03		- 33%	

Tab.5b. Veränderung der Pyruvat-Bildung von Schnitten aus normalem und kältegeschädigtem Kaninchenhirn durch einige Substanzen.

Vers.-Nr.	Substanz	Pyruvat-Bildung µg / mg Trs. · Std.				Veränderung %	
		Kontrolle		+ Substanz			
		Normal	Ödematös	Normal	Ödematös	Normal	Ödematös
F 6	2.4-Dinitrophenol 0,1 mM	0,42 ±0,00	0,37 ±0,00	1,12 ±0,34	1,56 ±0,52	+ 297%	+ 574%
F 7	2.4-Dinitrophenol 0,05 mM	0,41 ±0,05	0,52 ±0,05	0,87 ±0,19	1,31 ±0,03	+ 191%	+ 257%
Tr.18	Etacrynsäure 1 mM	0,66 ±0,09		1,17 ±0,06		+ 126%	
Tr.19	Etacrynsäure 1 mM	0,86 ±0,03		1,14 ±0,17		+ 54%	
Tr.21	Etacrynsäure 1 mM	0,70 ±0,11		0,86 ±0,03		+ 40%	
	Etacrynsäure 0,5 mM			1,00 ±0,08		+ 73%	

6. Schwellung

In den Tabellen 6 ist die Schwellung der Hirnschnitte unter dem Einfluß der Substanzen angegeben. Entsprechend dem Vorgehen von FRANCK (34) ist die Schwellung in Prozent des anfänglichen Frischgewichtes der Schnitte ausgedrückt. Sie wird nach folgender Formel berechnet:

$$S = \frac{T_A}{T_E} - 1 \cdot 100$$

Hierbei bedeuten T_A und T_E den Trockensubstanz-Gehalt der Schnitte am Anfang und am Ende des Versuches, ausgedrückt in %.

In der Tabelle 7 ist die Schwellung für zwei Serien von Versuchen angegeben, die in Abwesenheit bzw. in Gegenwart von 5 mM Glukose als energieliefernde Substrat durchgeführt wurden.

Tab.6. Veränderung der Schwellung von Schnitten aus normalem und kältegeschädigtem Kaninchenhirn durch einige Substanzen.

Vers.-Nr.	Substanz	Schwellung S: % des anfängl. Frischgew.				Veränderung	
		Kontrolle		+ Substanz			
		Normal	Ödematös	Normal	Ödematös	Normal	Ödematös
F 3	NaF 2 mM	101 ± 5	96 ± 2	93 ± 2	96 ± 3	- 8	± 0
F 2	NaF 1 mM	101 ± 3	94 ± 1	94 ±12	104 ±11	- 7	+ 10
L 2	Jodessigsäure 1 mM	93 ± 6	85 ± 1	93 ± 2	96 ± 0	± 0	+ 11
G 9	Glycerinaldehyd 10 mM	98 ± 4	88 ± 1	104 ± 0	102 ± 1	+ 6	+ 14
G 10	Glycerinaldehyd 5 mM	92 ± 2	87 ± 0	106 ± 5	100 ± 2	+ 14	+ 13
K 9	Aescin 0,25 mM	99 ± 3	97 ± 2	109 ± 4	103 ± 4	+ 10	+ 6
K 10	Aescin 0,1 mM	100 ± 2	94 ± 2	117 ± 4	106 ± 3	+ 17	+ 12
L 9	Fumarsäure 5 mM	102 ± 3	88 ± 1	99 ± 2	88 ± 3	- 3	± 0

Tab.6. Veränderung der Schwellung von Schnitten aus normalem und kältegeschädigtem Kaninchenhirn durch einige Substanzen.

Vers.-Nr.	Substanz	Schwellung S: % des anfängl. Frischgew.				Veränderung	
		Kontrolle		+ Substanz			
		Normal	Ödematös	Normal	Ödematös	Normal	Ödematös
F 6	2.4-Dinitrophenol 0,1 mM	108 ± 1	108 ± 0	120 ± 4	119 ± 0	+ 12	+ 11
F 7	2.4-Dinitrophenol 0,05 mM	111 ± 5	94 ± 1	114 ± 11	100 ± 3	+ 3	+ 6
K 7	Strophantin 0,02 mM	109 ± 1	90 ± 2	128 ± 8	104 ± 1	+ 19	+ 14
F 10	Buformin 400 µg/ml	94 ± 0	98 ± 6	106 ± 1	101 ± 1	+ 12	+ 3
G 11	Buformin 100 µg/ml	86 ± 1	77 ± 3	85 ± 3	79 ± 1	- 1	+ 2
H 1	Buformin 60 µg/ml	77 ± 5	78 ± 0	76 ± 3	83 ± 4	- 1	+ 5
F 9	Buformin 40 µg/ml	109 ± 4	110 ± 2	104 ± 1	112 ± 7	- 5	+ 2
H 3	Buformin 40 µg/ml	82 ± 1	86 ± 2	90 ± 1	94 ± 5	+ 8	+ 8
H 2	Buformin 30 µg/ml	80 ± 2	84 ± 3	89 ± 5	90 ± 2	+ 9	+ 6

Fortsetzung Tab.6.

Vers.-Nr.	Substanz	Schwellung S: % des anfängl. Frischgew. Kontrolle Normal	Kontrolle Ödematös	+ Substanz Normal	+ Substanz Ödematös	Veränderung Normal	Veränderung Ödematös
H 11	Amuno 250 µg/ml	96 ± 10	82 ± 2	108 ± 0	96 ± 4	+ 12	+ 14
H 9	Amuno 62,5 µg/ml	86 ± 2	81 ± 4	89 ± 1	82 ± 2	+ 3	+ 1
Tr.18	Etacrynsäure 1 mM	115 ± 3		124 ± 8		+ 9	
Tr.19	Etacrynsäure 1 mM	114 ± 0		126 ± 2		+ 12	
Tr.21	Etacrynsäure 1 mM	103 ± 0		133 ± 15		+ 30	
	Etacrynsäure 0,5 mM			104 ± 2		+ 1	
Tr.23	Etacrynsäure 1 mM	118 ± 1		142 ± 1		+ 24	
	Etacrynsäure 0,8 mM			133 ± 3		+ 15	
	Etacrynsäure 0,6 mM			131 ± 2		+ 13	

Fortsetzung Tab.6.

Vers.-Nr.	Substanz	Schwellung S: % des anfängl. Frischgew. Kontrolle Normal	Kontrolle Ödematös	+ Substanz Normal	+ Substanz Ödematös	Veränderung Normal	Veränderung Ödematös
Tr.18	Etacrynsäure 0,1 mM	115 ± 3		111 ± 1		- 4	
	Etacrynsäure 0,01 mM			111 ± 2		- 4	
Tr.19	Etacrynsäure 0,1 mM	114 ± 0		110 ± 1		- 4	
Tr.21	Etacrynsäure 0,1 mM	103 ± 0		102 ± 3		- 1	

Tab.7. Veränderung der Schwellung von Schnitten aus normalem und kältegeschädigtem Kaninchenhirn bei Glucosemangel. (Mittelwerte ±Standardabweichungen; $N_{Serie\ B} = 10$; $N_{Serie\ N} = 4$).

Serie		Schwellung S: % d.anfängl.Frischgew. Normal	Ödematös
B	5 mM Glucose	79,6 ±3,2	73,1 ±3,0
N	Keine Glucose	111,4 ±5,7	110,4 ±4,9

IV. DISKUSSION

Wie zu erwarten war, wurde die Glykolyse der Hirnschnitte durch Fluorid, Jodacetat und Glycerinaldehyd gehemmt (68); andererseits hat der Entkoppler 2,4-Dinitrophenol die Glykolyse überaus stark gesteigert. Diese durch Manometrie (Tab.1) gewonnenen Ergebnisse werden durch die spezifischen Bestimmungen von Laktat (Tab.4) und Pyruvat (Tab.5) bestätigt. Eine starke Hemmwirkung auf die Glykolyse, manometrisch und durch Substrat-Bestimmungen ermittelt, übte auch 5 mM Fumarsäure aus. Diese Beobachtung dürfte aber keine grosse praktische Bedeutung haben. Unerwartet war für mich der starke Anstieg der aeroben Laktat-Bildung in Gegenwart von 0,02 mM Ouabain. Dieser Effekt widerspricht den Hemmwirkungen, den 1 mM Ouabain auf die Laktat-Bildung von Ehrlich-Aszites-Tumorzellen ausübt (93). Möglicherweise ist hier entscheidend, daß ich nur 1/50 der vorstehend angegebenen Konzentration eingesetzt habe und außerdem mit einem völlig anderen biologischen Material gearbeitet habe. Es ist denkbar, daß die von mir verwendete sehr niedrige Ouabain-Konzentration bereits eine Stimulierung der ATPase-Aktivität (79) ausgelöst und damit in ähnlicher Richtung gewirkt hat wie ein Zusatz von 2,4-Dinitrophenol.

Sehr interessant erscheint mir die Hemmwirkung des Aescins auf die Glykolyse, die sich zwar bei der manometrischen Untersuchung nur leicht auswirkt, bei der enzymatischen Bestimmung der Pyruvat-Bildung jedoch starke Hemmwirkungen zeigte. Wenn man die extrazellulären Laktat:Pyruvat-Quotienten als ein Maß für den Redoxzustand des NAD-NADH-Systems innerhalb der Zelle nimmt, so erfolgt unter Aescin-Einwirkung eine starke Verschiebung nach der reduzierten Seite. Aescin wurde viel-

fach für die Behandlung von Ödemen allgemein und auch speziell für die Therapie von Hirnödemen empfohlen (39, 74, 124, 126, 127, 128, 129). Eine therapeutische Wirkung des Aescins auf Ödeme möchte ich nicht völlig bezweifeln; denn sie kann auch über andere Mechanismen z.B. über die Beeinflussung der Kapillarpermeabilität wirken. Vom Glukose-Stoffwechsel her betrachtet, wirkt sich allerdings 0,25 mM Aescin ungünstig auf Hirngewebe aus.

Das hypoglykämisch wirkende Biguanid Buformin (14, 32, 36, 62, 69) steigerte die Glykolyse überaus stark (Tab.1b. und 4b.). Gewisse Hinweise auf eine Steigerung der Laktat-Bildung durch Buformin waren bereits nach Durchsicht der Literatur zu finden (4, 63, 71, 103, 109); nicht zu erwarten war die äußerst starke Wirkung des Buformins, wobei allerdings zu berücksichtigen ist, daß die von mir eingesetzten Konzentrationen wesentlich über denjenigen lagen, die bei klinischer Anwendung in vivo erreicht werden. Die Pyruvat-Bildung wurde durch Buformin nicht gesteigert; deshalb fand ich in völliger Übereinstimmung mit anderen Autoren (71, 103) einen starken Anstieg des Laktat:Pyruvat-Quotienten. Autoren, die keine Steigerung der Laktat-Bildung durch Buformin fanden (65, 104), arbeiteten mit geringeren Konzentrationen und verwandten anderes biologisches Material. Die Bedeutung der Glykolysesteigerung von Hirnschnitten durch Buformin wird später noch weiter zu diskutieren sein.

Das Antiphlogisticum Amuno (= Indomethazin) steigerte ebenfalls die Laktat-Bildung durch die Hirnschnitte und ließ die Pyruvat-Bildung unbeeinflußt.

Die Hemmwirkungen, die Etacrynsäure auf die Glykolyse verschiedener Gewebe ausüben soll (37, 38, 54), konnte ich nur mit den Konzentrationen 0,01 mM bis 0,1 mM bestätigen. Dieser

Konzentrationsbereich hemmte aber nur die Pyruvat-Bildung in nennenswertem Ausmaß, während die Laktat-Bildung nur ganz gering erniedrigt wurde (Tab.5a. und 4a.). Die von anderen Autoren vorwiegend angewandten Konzentrationen 0,5 mM bis 1 mM übten umgekehrt auf die von mir untersuchten Hirnschnitte eine äußerst starke Steigerung der Glykolyse aus (Tab.1b., 4b., 5b.), wobei die Laktat-Bildung stärker gesteigert wurde als die Pyruvat-Bildung.

Die Hemmstoffe der Glykolyse Jodessigsäure, Glycerinaldehyd und Aescin hemmten auch die manometrisch gemessene Atmung der Hirnschnitte, allerdings in wesentlich geringerem Ausmaß. Atmungshemmungen wurden aber auch durch Substanzen ausgelöst, welche die Glykolyse steigern wie Etacrynsäure und Buformin. Ein Widerspruch besteht hier zu einer Arbeit (99), in der über vermehrte Oxydation von Glukose zu CO_2 unter dem Einfluß von Buformin berichtet wird. Möglicherweise ist aber einfach der Konzentrationsunterschied eine Erklärung für die unterschiedliche Wirkung von Buformin auf die respiratorische CO_2-Bildung. Die Wirkungen von Natriumfluorid auf die Atmung der Hirnschnitte waren nicht sehr ausgeprägt und uneinheitlich. In Gegenwart des Entkopplers 2,4-Dinitrophenol war die O_2-Aufnahme der Hirnschnitte erwartungsgemäß stark erhöht. Die ebenfalls deutliche Steigerung der O_2-Aufnahme in Gegenwart von 0,02 mM Ouabain legt den bereits früher in der Diskussion geäußerten Verdacht nahe, daß die relativ niedrige Ouabain-Konzentration bereits stimulierend auf die ATPase-Aktivität wirkte. De PIRAS et al. (91) fanden zwar eine Hemmung der Atmung von Hirnschnitten durch Ouabain, in völliger Übereinstimmung mit meinen Ergebnissen beobachteten jedoch SWANSON et al. (113) eine Atmungssteigerung. Sie wandten die 5fache

Konzentration von Ouabain an und erreichten etwa den 3fachen Effekt. In der gleichen Richtung wie 2,4-Dinitrophenol und Ouabain wirkte auch Amuno auf die Atmung, wenn es auch in relativ hohen Konzentrationen verwendet wurde.

Der Glukose-Verbrauch ändert sich allgemein etwa gleichsinnig mit der Glykolyse; denn bei der Milchsäure- und Brenztraubensäure-Bildung wird relativ bedeutend mehr Glukose abgebaut als bei der Atmung. Dementsprechend erniedrigten die Hemmstoffe der Glykolyse Natriumfluorid, Jodacetat, Glycerinaldehyd, Aescin, Fumarat und niedrige Konzentrationen von Etacrynsäure (Tab.3a.) auch den Glukose-Abbau. Andererseits wurde der Glukose-Verbrauch durch die Entkoppler bzw. Stimulatoren der Glykolyse 2,4-Dinitrophenol, Ouabain, Buformin, Amuno und höhere Konzentrationen von Etacrynsäure stark gesteigert (Tab.3b.).

Nach diesen Betrachtungen über die Richtung der Stoffwechselwirkungen sollen noch zwei Erörterungen über die Quantität selbst angestellt werden:
Zunächst ein Vergleich der manometrisch und enzymatisch ermittelten Laktat-Bildung (Tab.1 und Tab.4). Man sollte eine weitgehende zahlenmäßige Übereinstimmung der nach beiden Methoden ermittelten Stoffwechselgrößen und ihrer Veränderungen erwarten. Die Stoffwechselgrößen selbst sind nicht ohne weiteres miteinander vergleichbar, da sie in verschiedenen Dimensionen angegeben sind; aber auch eine Umrechnung brächte keine gute Übereinstimmung. Die prozentual ausgedrückten Effekte der Substanzen stimmen zwar oft zahlenmäßig recht gut überein, es kommen aber auch beträchtliche Abweichungen vor. Der Grund liegt darin, daß die Manometrie eine echte kinetische Methode ist und somit die Geschwindigkeit von

Stoffwechselvorgängen erfaßt. Die Bestimmung des Laktat-Gehaltes der Lösungen und die Umrechnung der erhaltenen Konzentrationen auf die Laktat-Bildung pro Stunde führt aber allgemein zu überhöhten Werten, weil post mortem in dem unter Sauerstoffmangel stehenden Gehirn große Mengen von Milchsäure gebildet werden, die natürlich in die Reaktionsgefäße mit den Schnitten eingebracht und bei den Bestimmungen am Ende der Versuche miterfaßt werden. Diese Überhöhung der Laktat-Werte führt im allgemeinen dazu, daß die auf prozentualer Basis berechneten Effekte kleinere Zahlenwerte ergeben als die Stoffwechselgrößen der Manometrie. (Bei diesen Vergleichen wurde die Pyruvat-Bestimmung nicht berücksichtigt, weil sie allgemein bedeutend geringere Werte ergibt als die Milchsäure-Bestimmung).

Außerdem soll geprüft werden, ob die Wirkungen der in meiner Arbeit angewandten Substanzen auf Glykolyse, Atmung und Glukose-Verbrauch von Hirnschnitten aus normalem und ödematösem (kältegeschädigtem) Gehirn unterschiedlich sind. Unterschiede in der Richtung der Wirkungen wurden mit Ausnahme eines Versuches mit Amuno nie beobachtet; aber zahlenmäßige Unterschiede kamen durchaus vor. Hier sollen nur Ergebnisse Beachtung finden, die besonders ausgeprägt erscheinen bzw. in mehreren Versuchen reproduzierbar waren: Die Glykolyse-Steigerung durch Ouabain, Buformin und Amuno (Tab.1b.) war bei normalem Gewebe bedeutend stärker als bei ödematösem. Möglicherweise liegt der Grund darin, daß die Schnitte aus ödematösem Gehirn ohnehin eine stärkere Glykolyse haben, die dann nicht mehr in so hohem Maße steigerungsfähig ist (Limitierung durch den Glukose-Transport oder durch intrazelluläre Enzym-Aktivitäten?).

Bei den Effekten auf die Pyruvat-Bildung fallen nur die beiden Versuche mit 2,4-Dinitrophenol auf. Allerdings sind die Reaktionsunterschiede hier so stark ausgeprägt, daß sie eingehende Beachtung in der Erforschung von Hirnödemen finden sollten. Die Pyruvat-Bildung der Schnitte aus ödematösem Gehirn wird nämlich durch 2,4-Dinitrophenol in wesentlich stärkerem Maße gesteigert als die Pyruvat-Bildung der Schnitte aus normalem Gehirn.
Die Atmung, die ohnehin durch sämtliche Substanzen nicht sehr stark beeinflußt wurde, unterliegt allgemein etwa den gleichen Einflüssen, unabhängig ob die Schnitte aus normalem Gehirn oder aus der ödematösen Hemisphäre des gleichen Tieres angefertigt wurden. Auch bei der Atmung fällt auf, daß 2,4-Dinitrophenol auf Schnitte aus ödematösem Gehirn eine bedeutend stärkere Stimulation ausübt als auf die Kontrollschnitte. Es ist denkbar, daß im Ödem auch durch äußere Zusätze ein noch stärkerer Grad von Entkopplung zu erreichen ist als im Normalgewebe.
Auf den Glukose-Verbrauch von normalen und ödematösen Hirnschnitten hatte keine der untersuchten Substanzen eine stark unterschiedliche Wirkung.

In Tabelle 6 sind die Veränderungen der in vitro-Schwellung der Hirnschnitte unter dem Einfluß der zugesetzten Substanzen angegeben. Die Schwellung blieb relativ konstant oder nahm sogar etwas ab in Gegenwart von Natriumfluorid, Fumarsäure, hohen Konzentrationen von Buformin und sehr geringen Konzentrationen von Etacrynsäure. In allen anderen Versuchen wurde eine starke Zunahme der Wasseraufnahme der Schnitte in Gegenwart der zugesetzten Substanzen beobachtet.
Was bedeutet das? Die Schwellung von Hirn- und auch anderen

Gewebsschnitten in vitro ist ein seit längerer Zeit bekannter Vorgang. Sie tritt bereits ohne Einwirkung von Chemikalien auf (18, 34, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88), und darf wohl als Ausdruck der Gewebsschädigung durch das Herausschneiden aus seinem natürlichen Verband und infolge der Inkubation in einem relativ unnatürlichen Medium angesehen werden. (Sie ist ein völlig anderer Vorgang als die Schwellung von Mitochondrien in vitro (7, 97), die gerade dann eintritt, wenn das Mitochondrion verstärkt stoffwechselt und dabei Energie bildet). Es ist auch bereits aus der Literatur bekannt, daß Hemmstoffe des Glukose-Stoffwechsels, Entkoppler, Anoxie und Einwirkung von Glutamat die in vitro-Schwellung verstärken (51, 66, 68, 114).

Diese bereits bekannten Beobachtungen wurden in meiner Arbeit mit den Substanzen Jodessigsäure, Glycerinaldehyd, 2,4-Dinitrophenol und Ouabain bestätigt. Übereinstimmung in der Vorstellung über die Energieabhängigkeit der in vitro-Schwellung brachte auch die Tabelle 7, aus der klar hervorgeht, daß ein Energiemangel infolge Entzug von Glukose zu einer starken Steigerung der Wasseraufnahme führt.

Im Widerspruch zu den allgemein anerkannten Theorien stehen nur die Ergebnisse der Versuche mit Natriumfluorid und Fumarsäure. Fumarsäure hemmte zwar die Glykolyse beträchtlich (Tab.1a.), die Schwellung nahm jedoch nicht zu. Entweder liegt hier ein Meßfehler vor, oder andere Mechanismen, die nicht bekannt sind, kompensieren den durch Glykolyse-Hemmung aufgetretenen Energiemangel. Vielleicht trat auch eine kleine Erhöhung der Schwellung auf, die aber auf osmotischem Wege durch die relativ hohe Konzentration der Dikarbonsäure kompensiert wurde. Beim Natriumfluorid muß ebenfalls an einen Meßfehler gedacht werden; allerdings fällt auf, daß lediglich

die Schwellung der Schnitte aus gesunden Hirngewebe unter dem Einfluß von Natriumfluorid abnahm. Möglicherweise liegt auch hier, ähnlich wie in der Stoffwechselreaktion bei Zugabe von 2,4-Dinitrophenol, ein grundsätzlicher Unterschied zwischen normalem und ödematösem Hirngewebe.

Neu erkannt wurde in meiner Arbeit, daß auch Aescin, Buformin, Amuno und Etacrynsäure die in vitro-Schwellung der Hirnschnitte deutlich verstärken. Was bedeuten diese Beobachtungen in biochemischer Hinsicht, und gibt es eventuell hieraus resultierende klinische Konsequenzen?

Aescin wurde klar als ein Hemmstoff des oxydativen Glukose-Abbaues erkannt. Der infolge der Atmungshemmung auftretende Energiemangel verstärkt die Schwellung der Schnitte. Aus metabolischer Sicht ist demnach nicht zu erwarten, daß Aescin-Anwendung zu einer Verringerung von Hirnschwellungen in vivo führt.

Buformin verstärkt zwar den glykolytischen Glukose-Abbau sehr stark, die Schwellung der Schnitte nimmt jedoch in Gegenwart von 30 bis 40 mg Buformin pro kg deutlich zu. Das bedeutet, daß die Glykolyse von der Energiebildung entkoppelt sein muß. Dieser Effekt ist in gewisser Übereinstimmung mit Beobachtungen, die SÖLING (109) schon vor einigen Jahren machte. Die geringfügige Abnahme der Schwellung in Gegenwart von 40 bis 100 µg Buformin pro ml ist eventuell darauf zurückzuführen, daß in diesen Versuchen die starke Erhöhung der extrazellulären Milchsäure-Konzentration über eine Erhöhung des osmotischen Druckes Wasser in geringem Maße aus den Schnitten entfernt. Eine klinische Bedeutung dürfte die Entkopplung der Glykolyse durch Buformin jedoch nicht haben, weil derartig hohe Konzentrationen, wie in meinen Versuchen

eingesetzt, nie angewandt werden.

Auch die in den Warburg-Versuchen eingesetzten Konzentrationen von Amuno waren in Bezug auf klinische Verhältnisse sehr hoch. Die beobachtete Entkopplung der Glykolyse, die aus den gleichen Gründen wie beim Buformin und 2,4-Dinitrophenol gefolgert werden muß, führt tatsächlich zu einer so starken Schwellungserhöhung in vitro, daß zumindest vor Überdosierungen der ohnehin oft mißbrauchten Substanz gewarnt werden muß.

Etacrynsäure verursachte in höheren Konzentrationen (0,5 bis 1 mM) starke Erhöhungen der Wasseraufnahme der Hirnschnitte. Gerade diese höheren Konzentrationen verstärkten aber die Glykolyse in beträchtlichem Ausmaß, während die in der Literatur berichteten Glykolyse-Hemmungen nur unterhalb 0,5 mM und auch dort nur in Bezug auf Glukose-Verbrauch und Pyruvat-Bildung beobachtet wurden. 0,5 bis 1 mM Etacrynsäure scheint deshalb ebenfalls in einer solchen Richtung zu wirken, daß die Glykolyse zwar verstärkt wird, der Gewinn chemischer Energie jedoch beträchtlich abnimmt. Diese Ergebnisse werden demnächst veröffentlicht werden (130) und bedeuten, daß im Hinblick auf den Stoffwechsel und auf den stoffwechselmäßig regulierten Wassergehalt von Hirngewebe eine Behandlung von Hirnödemen mit dem Diuretikum Etacrynsäure höchstens in solchen Dosierungen zulässig ist, daß eine Konzentration von etwa 0,1 mM nicht überschritten wird.

V. ZUSAMMENFASSUNG

Glykolyse (manometrisch und durch Laktat- und Pyruvat-Bestimmungen), Sauerstoff-Aufnahme, Glukose-Verbrauch und Wasser-Aufnahme von Schnitten aus normalem und kältegeschädigtem Kaninchenhirn wurden gemessen.
Die Glykolyse wurde gehemmt durch 1 - 2 mM Natriumfluorid, 1 mM Jodacetat, 5 - 10 mM Glycerinaldehyd, 0,25 mM Aescin und 5 mM Fumarsäure.
Die Glykolyse wurde gesteigert durch 0,05 - 0,1 mM 2,4-Dinitrophenol, 0,02 mM Ouabain, 30 - 400 µg Puformin/ml, 63 - 250 µg Amuno/ml und 0,5 - 1 mM Etacrynsäure.
Die Pyruvat-Bildung wurde gehemmt durch 1 - 2 mM Natriumfluorid, 1 mM Jodacetat, 5 - 10 mM Glycerinaldehyd, 0,02 mM Ouabain, 0,1 - 0,25 mM Aescin.
Die Pyruvat-Bildung wurde gesteigert durch 0,05 - 0,1 mM 2,4-Dinitrophenol und 0,5 - 1 mM Etacrynsäure.

Die Sauerstoff-Aufnahme wurde gehemmt durch 1 mM Jodessigsäure, 5 - 10 mM Glycerinaldehyd, 30 - 400 µg Buformin/ml, 0,25 mM Aescin und 0,01 - 1 mM Etacrynsäure.
Die Sauerstoff-Aufnahme wurde gesteigert durch 0,05 - 0,1 mM 2,4-Dinitrophenol, 0,02 mM Ouabain, 250 µg Amuno/ml und bei Schnitten aus der ödematösen Hemisphäre auch durch 1 - 2 mM Natriumfluorid.
Die Atmungshemmungen waren allgemein geringer als die Glykolysehemmungen.

Der Glukose-Verbrauch wurde gehemmt durch 1 mM Jodacetat, 5 - 10 mM Glycerinaldehyd, 0,1 - 0,25 mM Aescin, 5 mM Fumarsäure und 0,1 mM Etacrynsäure.

Der Glukose-Verbrauch wurde gesteigert durch 0,05 - 0,1 mM 2,4-Dinitrophenol, 0,02 mM Ouabain, 30 - 400 µg Buformin/ml, 63 - 250 µg Amuno/ml und 0,5 - 1 mM Etacrynsäure.

Die Schwellung der Hirnschnitte wurde durch alle erwähnten Substanzen mit Ausnahme von Natriumfluorid, Fumarsäure, hohe Konzentrationen von Buformin und 0,1 mM Etacrynsäure deutlich verstärkt.

Der Zusammenhang zwischen Beeinflussung des Stoffwechsels und Beeinflussung der Schwellung der Hirnschnitte wird diskutiert; von anderen Autoren publizierte Ergebnisse über Wirkungen von Inhibitoren und Entkopplern werden bestätigt. Aescin wurde als Hemmstoff des oxydativen Glukose-Abbaues erkannt, der die in vitro-Schwellung von Hirngewebe verstärkt. Es wurde erstmalig beobachtet, daß Buformin, Amuno und Etacrynsäure die Glykolyse verstärken und dabei die Bildung von chemischer, für den Wassertransport aus Hirnschnitten nutzbarer, Energie vermindern. Auf mögliche klinische Konsequenzen wird hingewiesen.

VI. LITERATURVERZEICHNIS

1. ABDEL-LATIF, A.A., YAMAGUCHI, M., SMITH, J. and YAMAGUCHI, T.: Studies on the effect of ouabain on sodium and phosphate uptake into nerve endings of developing rat brain. Life Sciences 7, (1968): 1325-1338

2. ARMSTRONG, W.McD.: Effect of external potassium and ouabain on sodium efflux from frog sartorius muscle. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 130, (1969): 1264-1270

3. BANERJEE, S.P., KHANNA, V.K. and SEN, A.K.: Inhibition of sodium- and potassium-dependent adenosine triphosphatase by ethacrynic acid: Ligand-induced modifications. Biochem. Pharmacol. 20, (1971): 1649-1660

4. BECKMANN, R., LINTZ, W. und NIJSSEN, J.: Steigerung der $^{14}CO_2$-Bildung aus ^{14}C-Glukose bei der Ratte durch das orale Antidiabetikum Butylbiguanid-hydrochlorid. Experientia 27, (1971): 127-129

5. BERGMEYER, H.U.: Methoden der enzymatischen Analyse. 2. Aufl., Bd. II, Verlag Chemie, Weinheim 1970, S. 1163 ff., 1407 ff., 1425 ff.

6. BICKIS, I.J. and QUASTEL, J.H.: Effects of metabolic inhibitor on energy metabolism of Ehrlich ascites carcinoma cells. Nature 205, (1965): 44-46

7. BIELAWSKI, J. and LEHNINGER, A.L.: Stoichiometric relationships in mitochondrial accumulation of calcium and phosphate supported by hydrolysis of adenosine triphosphate. J. Biol. Chem. 241, (1966): 4316-4322

8. BIRT, L.M. and BARTLEY, W.: The pyridine nucleotide metabolism of mitochondria incubated with and without added substrates and metabolic inhibitors. Biochem. J. 76, (1960): 427-438

9. BLASBERG, R., LEVI, G. and LAJTHA, A.: A comparison of inhibition of steady state, net transport, and exchange fluxes of amino acids in brain slices. Biochim. Biophys. Acta 203, (1970): 464-483

10. BOLTE, H.-D. und LÜDERITZ, B.: Intra-/extracellulärer Kaliumkonzentrationsgradient und g-Strophanthinwirkung (Ouabain) beim Kaliummangel. Untersuchungen an Skeletmuskelzellen. Klin. Wschr. 47, (1969): 889-891

11. BREUER, H., PARCHWITZ, H.K. und PECHTHOLD, I.: Zur Wirkung von 2,4-Dinitrophenol auf die durch Röntgenbestrahlung gesteigerte Atmung in Nierenschnitten. Z. Naturforsch. 15b, (1960): 469-470

12. BRØNDSTED, H.E.: Ouabain-sensitive carrier-mediated transport of glucose from the cerebral ventricles to surrounding tissues in the cat. J. Physiol. 208, (1970): 187-201

13. BRØNDSTED, H.E.: Transport of glucose, sodium, chloride and potassium between the cerebral ventricles and surrounding tissues in cats. Acta physiol. scand. 79, (1970): 523-532

14. BUTTERFIELD, W.J.H.: Effects of biguanides on peripheral tissues. Acta diabet. latin. 6, (1969): 644-655

15. CEREIJO-SANTALÓ, R.: Respiratory control and dehydrogenase activity. Canad. J. Biochem. 43, (1965): 425-436

16. CHAN, S.L. and QUASTEL, J.H.: Effects of neurotropic drugs on sodium influx into rat brain cortex in vitro. Biochem. Pharmacol. 19, (1970): 1071-1085

17. COE, E.L.: The reversal of the crabtree effect by iodoacetate. Biochim. Biophys. Acta 93, (1964): 209-211

18. COHEN, S.R., BLASBERG, R., LEVI, G. and LAJTHA, A.: Compartmentation of the inulin space in mouse brain slices. J. Neurochem. 15, (1968): 707-720

19. COOKE, W.J. and ROBINSON, J.D.: Factors influencing calcium movements in rat brain slices. Amer. J. Physiol. 221, (1971): 218-225

20. CREMER, J.E.: Studies on Brain-Cortex Slices. The influence of various inhibitors on the retention of potassium ions and amino acids with glucose or pyruvate as substrate. Biochem. J. 104, (1967): 223-228

21. DALLNER, G. and ERNSTER, L.: Effects of dinitrophenol and arsenate on the respiration and phosphorylation of Ehrlich ascites tumor cells and the mechanism of the Crabtree effect. Acta chem. scand. 17, (1963): 879-880

22. van DAM, K. and SLATER, E.C.: A suggested mechanism of uncoupling of respiratory-chain phosphorylation. Proc. Nat. Acad. Sci. 58, (1967): 2015-2019

23. DIANZANI, M.U. and DIANZANI MOR, M.A.: Decrease of phosphorus/oxygen ratios by dinitrophenol in vivo. Nature 179, (1957): 532

24. DITTMANN, J., HERRMANN, H.-D., LOEW, F. and OBERMANN, U.: Examination of the Metabolism of Oedematous Brain Tissue. II. The influence of the glucose concentration on the respiration and the aerobic glycolysis of normal and oedematous rabbit brain in vitro. Acta neurochir. 26, (1972): 61-82

25. DITTMANN, J.: Untersuchungen zum Glukose-Stoffwechsel von Schnitten aus normalem und ödematösem Hirngewebe. 1973, in Vorbereitung

26. DREWS, J., WAHL, P. und FÖLSCH, E.: Die Wirkung von Glycerinaldehyd auf Glycineinbau, Atmung und Gärung von Ascitestumorzellen. Klin. Wschr. 42, (1964): 776-779

27. EISENHARDT, R.H. and ROSENTHAL, O.: 2,4-Dinitrophenol: Lack of interaction with high-energy intermediates of oxidative phosphorylation. Science 143, (1964): 476-477

28. ERNSTER, L.: Reaction pathways of succinate-linked acetoacetate reduction in tissue homogenates and isolated mitochondria. Nature 193, (1962): 1050-1052

29. ERNSTER, L. and LEE, C.-P.: Biological oxidoreductions. Ann. Rev. Biochem. 33, (1964): 729-788

30. ESTRADA-O, S.: The release of mitochondrial enzymes by uncoupling agents. Arch. Biochem. Biophys. 106, (1964): 498-504

31. FARKAS, A. und RADÓ, F.: Über die Wirkung von Uregyt in ödematösen Zuständen. Therapia Hungarica 20, (1972): 34-38

32. FÖRSTER, H., HAGER, E. und MEHNERT, H.: Der Einfluß von Butylbiguanid im Tierversuch auf die Resorption von Glucose und Fructose. Arzneim.-Forsch. (Drug Res.) 15, (1965): 1340-1344

33. FORMANEK, K. und HOHENEGGER, M.: Zur Wirkung der Etacrynsäure auf die Natrium-, Kalium- und Wasserausscheidung von Ratten bei oraler Applikation. Arzneim.-Forsch. (Drug Res.) 21, (1971): 1030-1032

34. FRANCK, G., CORNETTE, M. and SCHOFFENIELS, E.: The cationic composition of incubated cerebral cortex slices. J. Neurochem. 15, (1968): 843-857

35. GOLDSCHMIDT, D., MORELIS, R., GAUDEMER, Y. et GAUTHERON, D.: Influence de l'ethacrynate sur la perméabilité des mitochondries de foie de rat aux cations K^+ et Mg^{++}. Bull. Soc. Chim. Biol. 52, (1970): 523-529

36. GOMEZ, F. and FELBER, J.P.: Metabolic effects of butylbiguanide during long lasting intravenous glucose infusion in normal human subjects. Horm. Metab. Res. 2, (1970): 72-75

37. GORDON, E.E. and de HARTOG, M.: The relationship between cell membrane potassium ion transport and glycolysis. J. Gener. Physiol. 54, (1969): 650-663

38. GORDON, E.E. and de HARTOG, M.: Localization and characterization of the inhibitory action of ethacrynic acid on glycolysis. Biochem. Pharmacol. 20, (1971): 2339-2348

39. HAMPEL, H., HOFRICHTER, G., LIEHN, H.-D. und SCHLEMMER, W.: Zur Pharmakologie der Aescin-Isomere unter besonderer Berücksichtigung von α-Aescin. Arzneim.-Forsch. (Drug Res.) 20, (1970): 209-215

40. HERRMANN, H.-D. and DITTMANN, J.:
Examination of the Metabolism of Oedematous Brain Tissue. I. Alterations of the metabolism in the cold-induced oedema of the rabbit brain measured manometrically in vitro.
Acta neurochir. 22, (1970): 167-175

41. den HERTOG, A. and RITCHIE, J.M.:
A comparison of the effect of temperature, metabolic inhibitors and of ouabain on the electrogenic component of the sodium pump in mammalian non-myelinated nerve fibres.
J. Physiol. 204, (1969): 523-538

42. HESS, H.H.:
Effect of Na^+ and K^+ on Mg^{++}-stimulated adenosinetriphosphatase activity of brain.
J. Neurochem. 9, (1962): 613-621

43. HO, R.J. and JEANRENAUD, B.:
Insulin-like Action of Ouabain.
I. Effect on carbohydrate metabolism.
Biochim. Biophys. Acta 144, (1967): 61-73

44. HO, R.J., JEANRENAUD, B., POSTERNAK, Th. and RENOLD, A.E.:
Insulin-like Action of Ouabain.
II. Primary antilipolytic effect through inhibition of adenyl cyclase.
Biochim. Biophys. Acta 144, (1967): 74-82

45. HUGGINS, A.K., SMITH, M.J.H. and MOSES, V.: Uncoupling Reagents and Metabolism. 3. Effects of salicylate and 2:4-dinitrophenol on the incorporation of ^{14}C from labelled pyruvate into the soluble intermediates of isolated rat tissues. Biochem. J. 79, (1961): 271-275

46. HUTCHISON, J.C.: Ethacrynic acid. A non-diabetogenic diuretic. Penn.Med. 72, (1969): 65-67

47. ISHII, S.: Brain swelling: Studies of structural, physiologic, and biochemical alterations. Head Injury, Conference Proceedings. Eds.: CAVENESS, W.F. and WALKER, A.E., J.B. Lippincott Company, Philadelphia and Toronto 1966, p. 276

48. ISHII, S., TSUJI, H., OZAWA, K., KONDO, Y. and EVANS, J.P.: Brain Edema. Some clinical and experimental correlations, in: Brain Edema. Eds.: KLATZO, I. and SEITELBERGER, F., Springer Verlag, Wien und New York 1967, p. 32

49. ITOKAWA, Y. and COOPER, J.R.: Ion Movements and Thiamine in Nervous Tissue. I. Intact nerve preparations. Biochem. Pharmacol. 19, (1970): 985-992

50. IZZARD, S. and TEDESCHI, H.: Ion transport underlying metabolically controlled volume changes of isolated mitochondria. Proc. Nat. Acad. Sci. 67, (1970): 702-709

51. JOANNY, P. and HILLMAN, H.H.: Substrates and the potassium and sodium levels of guinea pig: Cerebral cortex slices in vitro: Effects of application of electrical pulses, of inhibitors and of anoxia. J. Neurochem. 10, (1963): 655-664

52. JONES, C.T. and BANKS, P.: The effect of electrical stimulation and ouabain on the uptake and efflux of L-[U-^{14}C]valine in chopped tissue from guinea-pig cerebral cortex. Biochem. J. 118, (1970): 801-812

53. KATTERMANN, R., DOLD, U. und HOLZER, H.: D-Glycerat beim Fructoseabbau in der Leber. Biochem. Z. 334, (1961): 218-226

54. KLAHR, S., YATES, J. and BOURGOIGNIE, J.: Inhibition of glycolysis by ethacrynic acid and furosemide. Amer. J. Physiol. 221, (1971): 1038-1043

55. KOHN, P.G. and CLAUSEN, T.: The Relationship between the Transport of Glucose and Cations across Cell Membranes in Isolated Tissues. VI. The effect of insulin, ouabain, and metabolic inhibitors on the transport of 3-O-methylglucose and glucose in rat soleus muscles. Biochim. Biophys. Acta 225, (1971): 277-290

56. KRAMAR, R. und KAISER, E.: Hemmung von SH-Enzymen durch Ethacrynsäure. Experientia 26, (1970): 485-486

57. KRECKE, H.-J., KLEIN, H., UHSE, H.G. und KRÜCK, F.: Renale Hämodynamik, Elektrolytausscheidung und Säure-Basen-Haushalt unter Etacrynsäure im akuten Versuch beim Menschen. Klin. Wschr. 49, (1971): 397-405

58. KVAMME, E.: Glycolysis and Respiration in Ehrlich Ascites Tumour Cells. II. Effect of IAA and DNP. Acta physiol. scand. 42, (1958): 219-230

59. LAMB, J.F. and MacKINNON, M.G.A.: Effect of ouabain and metabolic inhibitors on the Na and K movements and nucleotide contents of L cells. J. Physiol. 213, (1971): 665-682

60. LANDON, E.J. and FITZPATRICK, D.F.: Ethacrynic acid and kidney cell metabolism. Biochem. Pharmacol. 21, (1972): 1561-1568

61. LEHNINGER, A.L. and WADKINS, C.L.: Oxidative phosphorylation. Ann. Rev. Biochem. 31, (1962): 47-78

62. LIEBERMEISTER, H., JAHNKE, K., DAWEKE, H., GRIES, F.A., GRÜNEKLEE, D. und SCHILLING, W.: Einfluß akuter und chronischer Buforminbehandlung auf zirkulierende Metabolite des Fettstoffwechsels und das Seruminsulin bei Adipösen ohne manifesten Diabetes. Fettstoffwechsel 5, (1969): 58-61

63. LOSERT, W., LOGE, O. und SCHILLINGER, E.: Untersuchungen zu der durch N_1-(n-Butyl)-biguanid (Buformin) im Tierexperiment verursachten Hypoglykämie. Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmak. 264, (1969): 275

64. LUDT, H. and DITTMANN, J.: Computer programs for the numerical and graphic evaluation of two-vessel manometry experiments and for the calculation of substrate determinations. Computer Programs in Biomedicine 2, (1972): 277-290

65. LÜHRS, W. und CHROMETZKA, K.: Anaerobe Glykolyse bei Ehrlich-Aszites-Tumorzellen. Z. Klin. Chem. 3, (1965): 25-29

66. LUND-ANDERSEN, H. and HERTZ, L.: Effects of potassium and of glutamate on swelling and on sodium and potassium content in brain-cortex slices from adult rats. Exp. Brain Res. 11, (1970): 199-212

67. MACKNIGHT, A.D.C.: The effects of ethacrynic acid on the electrolyte and water contents of rat renal cortical slices. Biochim. Biophys. Acta 173, (1969): 223-233

68. McILWAIN, H. and BACHELARD, H.S.: Biochemistry and the Central Nervous System. 4. Ed., Churchill Livingstone, Edinburgh and London 1971, pp. 76, 88

69. MEHNERT, H.: Mode of action of blood glucose lowering biguanides: Clinical aspects. Acta diabet. latin. 6, (1969): 678-684

70. MENDEL, B.: Krebszelle und Glycerinaldehyd. Klin. Wschr. 8, (1929): 169-170

71. MICHAELIS, D., LIPPMANN, H.G. und KÖHLER, E.: Wirkung intravenös applizierten N_1-n-Butylbiguanids auf die Metaboliten des Kohlenhydrat- und Fettstoffwechsels bei Diabetikern. Dtsch. Ges.wesen 25, (1970): 870-874

72. MINER, L.C. and REED, D.J.: The effect of ethacrynic acid on sodium uptake into the cerebrospinal fluid of the rat. Arch. int. Pharmacodyn. Thér. 190, (1971): 316-321

73. MIYAZAKI, Y., SUEMATSU, K. and NAKAMURA, J.: Effect of ethacrynic acid on lowering of intracranial pressure. Arzneim.-Forsch. (Drug Res.) 19, (1969): 1961-1965

74. MUSSGNUG, G.: Zur Biochemie der Entzündung und Ödembildung sowie der Pharmakokinetik des Aescins. Arzneim.-Forsch. (Drug Res.) 19, (1969): 1588-1593

75. OCHS, S. and SMITH, C.B.: Fast axoplasmic transport in mammalian nerve in vitro after block of glycolysis with iodoacetic acid. J. Neurochem. 18, (1971): 833-843

76. OELERT, H. und SEBENING, F.: Die diuretische Wirkung von Etacrynsäure in der Behandlung der postoperativen Herzinsuffizienz. Dtsch. med. Wschr. 93, (1968): 1550-1555

77. OKAMOTO, K. and QUASTEL, J.H.: Tetrodotoxin-sensitive uptake of ions and water by slices of rat brain in vitro. Biochem. J. 120, (1970): 37-47

78. OPIT, L.J. and CHARNOCK, J.S.: A molecular model for a sodium pump. Nature 208, (1965): 471-474

79. OPPELT, W.W. and PALMER, R.F.: Stimulation of cerebrospinal fluid production by low doses of intraventricular ouabain. J. Pharmacol. Exp. Ther. 154, (1966): 581-585

80. PAPPIUS, H.M.: The distribution of water in brain tissues swollen in vitro and in vivo. Progress in Brain Res. 15, (1965): 135-154

81. PAPPIUS, H.M.: Biochemical studies on experimental brain edema. In: Brain Edema. Eds.: KLATZO, I. and SEITELBERGER, F., Springer Verlag, Wien und New York 1967, pp. 445-460

82. PAPPIUS, H.M.: Fluid and ion distribution in brain slices in vitro. Überlassung eines im Druck befindlichen Buch-Manuskriptes.

83. PAPPIUS, H.M. and McCANN, W.P.: Effects of steroids on cerebral edema in cats. Arch. Neurol. 20, (1969): 207-216

84. PAPPIUS, H.M. and DAYES, L.A.: Hypertonic Urea. Its effect on the distribution of water and electrolytes in normal and edematous brain tissues. Arch. Neurol. 13, (1965): 395-402

85. PAPPIUS, H.M. and ELLIOTT, K.A.C.: Water distribution in incubated slices of brain and other tissues. Canad. J. Biochem. Physiol. 34, (1956): 1007-1022

86. PAPPIUS, H.M. and ELLIOTT, K.A.C.: Factors affecting the potassium content of incubated brain slices. Canad. J. Biochem. Physiol. 34, (1956): 1053-1067

87. PAPPIUS, H.M. and GULATI, D.R.: Water and electrolyte content of cerebral tissues in experimentally induced edema. Acta neuropath. 2, (1963): 451-460

88. PAPPIUS, H.M., KLATZO, I. and ELLIOTT, K.A.C.: Further studies on swelling of brain slices. Canad. J. Biochem. Physiol. 40, (1962): 885-898

89. PENEFSKY, H.S., PULLMAN, M.E., DATTA, A. and RACKER, E.: Partial Resolution of the Enzymes Catalyzing Oxidative Phosphorylation. II. Participation of a soluble adenosine triphosphatase in oxidative phosphorylation. J. Biol. Chem. 235, (1960): 3330-3336

90. PERIN, A.: Fosforilazione ossidativa in presenza di DL- e D-gliceraldeide. Lo Sperimentale 113, (1963): 297-308

91. de PIRAS, M.M. and ZADUNAISKY, J.A.: Effect of potassium and ouabain on glucose metabolism by frog brain. J. Neurochem. 12, (1965): 657-661

92. PITTS, B.J.R. and ASKARI, A.: Stimulation of the phosphatase activity of (Na^+, K^+)-ATPase preparations by ouabain. Biochim. Biophys. Acta 225, (1971): 388-391

93. POOLE, D.T., BUTLER, Th. C. and WILLIAMS, M.E.: Effects of valinomycin, ouabain, and potassium on glycolysis and intracellular pH of Ehrlich ascites tumor cells. J. Membrane Biol. 5, (1971): 261-276

94. PULLMAN, M.E., PENEFSKY, H.S., DATTA, A. and RACKER, E.: Partial Resolution of the Enzymes Catalyzing Oxidative Phosphorylation. I. Purification and properties of soluble, dinitrophenol-stimulated adenosine triphosphatase. J. Biol. Chem. 235, (1960): 3322-3329

95. QUELLHORST, E. und SCHELER, F.: Untersuchungen über die Wirksamkeit von Ethacrynsäure, Amiloride-HCl und Aldadiene-K bei Niereninsuffizienz. Klin. Wschr. 48, (1970): 471-480

96. ROLLESTON, F.S. and NEWSHOLME, E.A.: Effect of ouabain on glucose metabolism in cerebral cortex slices. Biochem. J. 101, (1966): 41P-42P

97. ROSSI, C.S. and LEHNINGER, A.L.: Stoichiometric relationships between accumulation of ions by mitochondria and the energy-coupling sites in the respiratory chain. Biochem. Z. 338, (1963): 698-713

98. SCHARFF, Th.G. and MONTGOMERY, O.L.: Effect of glycolaldehyde, glyceraldehyde, and related compounds on anaerobic metabolism in the rabbit lens. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 134, (1970): 658-662

99. SCHILLINGER, E., KRAAZ, W., LOGE, O. und LOSERT, W.: Verstärkung der hypoglykämischen Wirkung von Insulin durch Buformin bei Ratten. Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmak. 266, (1970): 437

100. SCHOTT, A. and SIEGEL, G.: Effect of 2,4-dinitrophenol on energy metabolism in frog atria: Correlation between changes in metabolism and in K^+-ion movements across the membrane. Pflüger's Arch. 312, (1969): 29

101. SCHULZ, J. und HOFMANN, E.: Beeinflussung von Atmung, oxydativer Phosphorylierung und Glykolyse durch 2,4-Dinitrophenol in Ehrlich-Aszites-Tumorzellen. Acta biol. med. germ. 19, (1967): 705-722

102. SCHWARTZ, F.D., PILLAY, V.K.G. and KARK, R.M.: Ethacrynic acid: Its usefulness and untoward effects. Amer. Heart J. 79, (1970): 427-428

103. SEGRE, G.: Current views on the mode of action of blood glucose lowering biguanides. Acta diabet. latin. 6, (1969): 627-635

104. SENSI, S., CAPANI, F., CARADONNA, P. und NICCOLI, L.: Einfluß des Butyl-biguanids auf den Milchsäure-Stoffwechsel im Skelettmuskel des Diabetikers. Arzneim.-Forsch. (Drug Res.) 20, (1970): 142-147

105. SHIMIZU, H., CREVELING, C.R. and DALY, J.W.: Cyclic adenosine 3',5'-monophosphate formation in brain slices: Stimulation by batrachotoxin, ouabain, veratridine, and potassium ions. Molecul. Pharmacol. 6, (1970): 184-188

106. SKLENOVSKÝ, A., HRBEK, J., DOSTÁLOVÁ, K. und BIRKÁS, O.:
Der Einfluss von Ouabain und Ascorbinsäure auf den Metabolismus der freien Aminosäuren in vitro.
Acta Universitatis Palackianae Olomucensis 47, (1967): 309-317

107. SKLENOVSKÝ, A.:
Der Einfluss von 2,4-Dinitrophenol auf den Metabolismus der freien Gehirnaminosäuren in vitro.
Acta Universitatis Palackianae Olomucensis 47, (1967): 319-325

108. SMITH, M.J.H. and MOSES, V.:
Uncoupling Reagents and Metabolism.
1. Effects of salicylate and 2:4-dinitrophenol on the incorporation of ^{14}C from labelled glucose and acetate into the soluble intermediates of isolated rat tissues.
Biochem. J. 76, (1960): 579-585

109. SÖLING, H.-D.:
The effects of blood glucose lowering biguanides on liver metabolism.
Acta diabet. latin. 6, (1969): 656-677

110. STAHL, W.L. and SWANSON, P.D.:
Uptake of calcium by subcellular fractions isolated from ouabain-treated cerebral tissues.
J. Neurochem. 16, (1969): 1553-1563

111. STAHL, W.L. and SWANSON, P.D.: Movements of calcium and other cations in isolated cerebral tissues. J. Neurochem. 18, (1971): 415-427

112. SURANYI, E.M. and AVI-DOR, Y.: Swelling-contraction of mitochondria in hypotonic medium. Biochim. Biophys. Acta 118, (1966): 445-452

113. SWANSON, P.D. and ULLIS, K.: Ouabain-induced changes in sodium and potassium content and respiration of cerebral cortex slices: Dependence on medium calcium concentration and effects of protamine. J. Pharmacol. Exp. Ther. 153, (1966): 321-328

114. TERNER, C., EGGLESTON, L.V. and KREBS, H.A.: The role of glutamic acid in the transport of potassium in brain and retina. Biochem. J. 47, (1950): 139-149

115. TOWER, D.B.: Ouabain and the distribution of calcium and magnesium in cerebral tissues in vitro. Exp. Brain Res. 6, (1968): 273-283

116. TRENTHAM, D.R.: Aspects of the chemistry of D-glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase. Biochem. J. 109, (1968): 603-612

117. TRINER, L., KILLIAN, P. and NAHAS, G.G.: Ouabain hypoglycemia: Insulin mediation. Science 162, (1968): 560-561

118. VILLAMIL, M.F. and KLEEMAN, C.R.: The effect of ouabain and external potassium on the ion transport of rabbit red cells. J. Gener. Physiol. 54, (1969): 576-588

119. WARBURG, O.: Wasserstoffübertragende Fermente. Verlag W. Saenger, Berlin 1948

120. WARBURG, O., GAWEHN, K., GEISSLER, A.W. und LORENZ, S.: Über Heilung von Mäuse-Ascites-Krebs durch D- und L-Glycerinaldehyd. Z. Klin. Chem. 1, (1963): 175-177

121. WEINBACH, E.C.: Stability of oxidative phosphorylation and related reactions in isolated liver mitochondria. J. Biol. Chem. 234, (1959): 1580-1586

122. WILKINSON, H.A., WEPSIC, J.G. and AUSTIN, G.: Diuretic synergy in the treatment of acute experimental cerebral edema. J. Neurosurg. 34, (1971): 203-208

123. WILLIAMS, J.A., WITHROW, C.D. and WOODBURY, D.M.: Effects of ouabain and diphenylhydantoin on transmembrane potentials, intracellular electrolytes, and cell pH of rat muscle and liver in vivo. J. Physiol. 212, (1971): 101-115

124. WINKLER, W.: Die Aescinbestimmung in Roßkastanienextrakten und in Extrakt bzw. Aescin enthaltenden Zubereitungen. Arzneim.-Forsch. (Drug Res.) 18, (1968): 1031-1035

125. WOODBURY, D.M. and KEMP, J.W.: Some possible mechanisms of action of antiepileptic drugs. Pharmakopsychiat. 3, (1970): 201-226

126. ZOLTÁN, Ö.T., FEKETE, E., DOMONKOS, H. und FÖLDI, M.: Untersuchungen über das durch Triaethylzinnsulfat verursachte Hirnödem bei der Ratte. 1. Veränderungen des Wassergehaltes der Hirnsubstanz und deren therapeutische Beeinflussung mit Aescin. Arzneim.-Forsch. (Drug Res.) 19, (1969): 287-288

127. ZOLTÁN, Ö.T. und FÖLDI, M.: Untersuchungen über das durch Triaethylzinnsulfat verursachte Hirnödem bei der Ratte. 2. Die Wirkung von Aescin auf die Mortalität. Arzneim.-Forsch. (Drug Res.) 19, (1969): 288-289

128. ZOLTÁN, Ö.T. und FÖLDI, M.: Untersuchungen über das durch Triaethylzinnsulfat verursachte Hirnödem bei der Ratte. 3. Die Schädigung der Funktion des Zentralnervensystems und die therapeutische Wirkung von Aescin.
Arzneim.-Forsch. (Drug Res.) 19, (1969): 290-293

129. ZOLTÁN, Ö.T. und GORINI, S.: Das Verhalten des Liquordruckes beim experimentell durch Triaethylzinnsulfat verursachten Hirnödem.
Wirkung der Therapie mit Aescin.
Arzneim.-Forsch. (Drug Res.) 20, (1970): 1812-1813

130. DITTMANN, J., SEIFERT, E. and SEIFERT, H.-J.: Stimulation of the glycolysis of rabbit brain slices by ethacrynic acid.
Arzneim.-Forsch. (Drug Res.) 23, (1973): 591-593

Herrn Prof.Dr.med. F. Loew danke ich für die freundliche Überlassung des Themas.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr.rer.nat. J. Dittmann, der mir jederzeit mit Ratschlägen und tatkräftiger Unterstützung zur Seite stand und die anfallenden Probleme zu lösen half.

Außerdem möchte ich meiner Frau E. Seifert geb. Anselment für die Hilfe bei den experimentellen Bestimmungen und für das Schreiben der Arbeit herzlichst danken. Desgleichen sei auch den übrigen Mitarbeitern des Labors gedankt.

LEBENSLAUF

Am 21. September 1943 wurde ich als ältestes Kind des Kaufmanns Artur Seifert und dessen Ehefrau Bertl Seifert geb. Markert in Würzburg geboren. Im September 1949 erfolgte die Einschulung in die Volksschule Königshofen i. Grabfeld, im September 1955 Übertritt in das dortige Realprogymnasium, 1960 Wechsel an das Gymnasium in Bad Neustadt/Saale und 1963 Besuch des Gymnasiums in Hünfeld/Rhön bis zur Ablegung der Reifeprüfung im März 1965.
Im SS 1965 Einschreibung in die Medizinische Fakultät der Universität Mainz bis zur Ablegung des Physikums im SS 1968. Anschließend Immatrikulation im WS 1968 an der Universität des Saarlandes in Saarbrücken und Ablegung des Staatsexamens am 28. Januar 1972. Nach Erfüllung der Medizinalassistentenzeit in der II. Medizinischen Klinik in Homburg und im St. Josefs-Krankenhaus in Neunkirchen/Saar erfolgte am 19. März 1973 die Approbation. Seit 1. Mai 1973 leiste ich meine 15monatige Wehrpflicht bei der Bundeswehr ab.